



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 896**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05770534 .5**

96 Fecha de presentación : **26.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1773994**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Polipéptido.**

30 Prioridad: **26.07.2004 GB 0416651**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

73 Titular/es: **Bioneer A/S**  
**Kogle Allé 2**  
**2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es: **Kristensen, Peter**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 315 896 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

Polipéptido.

5 La presente invención se refiere a una cadena polipeptídica nueva que forma un pliegue tridimensional particular caracterizado por un sándwich  $\beta$ . Alterando la secuencia de aminoácidos en regiones específicas del polipéptido de la invención, se desarrollan características de unión nuevas. También se describen métodos para la generación de un polipéptido según la invención y utilizaciones de los polipéptidos de la invención.

#### 10 Antecedentes de la invención

El reconocimiento macromolecular tiene lugar cuando dos o más superficies pueden establecer suficientes puntos de contacto, permitiendo que se produzca una unión específica. Aunque el reconocimiento macromolecular es un fenómeno observado generalmente en todos los sistemas vivos, el mejor caracterizado ha sido el sistema inmunitario. Siendo un ejemplo el sistema inmunitario humano, que consiste en un gran número de moléculas de anticuerpo estructuralmente similares, que presentan cada una diferencias de secuencia minoritarias en las regiones variables de la estructura del anticuerpo. Estas pequeñas diferencias dan como resultado la generación de una pléthora de especificidades de unión.

20 Los anticuerpos que se producen de manera natural son proteínas de múltiples dominios compuestas por cadenas pesadas y ligeras. La estructura global del anticuerpo puede dividirse en dominios funcionales diferentes según su función biológica. Ciertas partes de la molécula de anticuerpo interacciona con moléculas receptoras en las células eucariotas, dando lugar así a una respuesta biológica, denominándose estas partes a menudo dominios constantes. Otras partes de la molécula de anticuerpo contienen un gran grado de variación de secuencia entre diferentes moléculas de anticuerpo, proporcionando así diferentes moléculas de anticuerpo con capacidad de unirse a una gama diversa de diferentes moléculas. Esta variación de secuencia observada en las partes variables de la molécula de anticuerpo permite que se cree un número inmenso de superficies estructurales diferentes. Cuando la región variable de un anticuerpo dado puede realizar interacciones suficientes con un antígeno, se produce una unión específica. La variación de secuencia de anticuerpos diferentes está confinada en seis regiones de bucle, tres en la cadena pesada y tres en la cadena ligera.

Estas regiones de bucle están dispuestas sobre una denominada estructura de sándwich  $\beta$ , en la que los bucles individuales conectan hebras  $\beta$  (Amit AG. 1986).

35 Se ha demostrado anteriormente que fragmentos más pequeños de la estructura del anticuerpo conservan sus propiedades de reconocimiento del antígeno. Al mismo tiempo, tal fragmento más pequeño puede proporcionar mejores reactivos en cierta aplicación terapéutica. De la manera más notable, se ha demostrado la generación de fragmentos de las partes variables, dando lugar a o bien fragmentos scFv en los que las partes variables de la cadena pesada y ligera están unidas mediante un ligador peptídico o una modificación por ingeniería genética artificial de un puente disulfuro para unir covalentemente la cadena pesada y ligera.

La tecnología de ADN recombinante ha proporcionado herramientas que permiten la generación *in vitro* de repertorios de moléculas de anticuerpo. Cuando se introducen los genes que codifican para tales anticuerpos en sistemas que permiten un ligamiento del genotipo con el fenotipo, es viable la selección de anticuerpos específicos basándose en sus características de unión (Marks JD *et al.* 1991). Lo más frecuentemente un sistema de este tipo ha sido el sistema de exposición en fago (Smith GP. 1985).

Se ha demostrado que la generación y selección de fragmentos de anticuerpo es una técnica poderosa para identificar moléculas de unión nuevas. Sin embargo, tales fragmentos de anticuerpo están compuestos por dos cadenas (pesada y ligera) que tienen que plegarse juntas con el fin de obtener una representación funcional de los segmentos de bucle para la unión a antígeno. A menudo, el plegado funcional de estas dos cadenas y su apareamiento funcional está alterado, proporcionando así un fragmento de anticuerpo inestable. Además, tienen que formarse varios puentes disulfuro intracatenarios para garantizar el plegado funcional de tales fragmentos de anticuerpo, limitando así las aplicaciones en las que la expresión intracelular es una cuestión. Los fragmentos de anticuerpo globales presentan una serie de inconvenientes graves.

Se han descrito varios armazones nuevos, todos los cuales presentan la característica común de que pueden adaptarse secuencias al azar, siendo los ejemplos el desarrollo del dominio Z (Nord K. *et al.* 1997), minicuerpo (Pessi A. *et al.* 1995), Tendamistat (McConnel SJ. y Hoess RH 1995), dedo de zinc (Choo Y. y Klug A. 1995), citocromo B<sub>562</sub> (Ku J. y Schults P.G. 1995), inhibidor de tripsina (Rottgen P. y Collins J. 1995), hélice enrollada sintética (Houston M.E. *et al.* 1996), proteínas tipo "knottin" (Smith G.P. *et al.* 1998), proteína fluorescente verde (Abedi M.R. *et al.* 1998), fibronectina (Koide A. *et al.* 1998), anticalina (Beste G. *et al.* 1999), CTLA-4 (Nuttall S.D. *et al.* 1999) y tetranectina (Graversen J.H. *et al.* 2000). Cada uno de estos armazones presenta ciertas características únicas que hacen que la aplicación en zonas definidas sea beneficiosa, pero como con los anticuerpos, cada uno también presenta varios inconvenientes. La siguiente invención presenta un armazón optimizado, generado para solucionar algunos de los problemas mencionados anteriormente, tales como la aplicación a la unión a ligando intracelular.

Las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) son una familia diversa de proteínas intracelulares. El papel fisiológico preciso de las FABP no se entiende completamente, pero la acumulación de evidencias sugiere que la función principal de las FABP es unirse a ácidos grasos, que muestran una solubilidad limitada, y ayudar de ese modo en el transporte de ácidos grasos (Stewart J.M. 2000).

5

Un suministro adecuado de ácidos grasos de cadena larga es importante para el funcionamiento apropiado de las células eucariotas. Los ácidos grasos actúan como bloques de construcción para los fosfolípidos de membrana y son un sustrato principal para la producción de energía. Además, los ácidos grasos son precursores de moléculas de señalización y mediadores de la expresión de diversos genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo lipídico. Las características de unión de H-FABP y su presencia predominante en fibras musculares de tipo I y IIA sugieren todavía su implicación funcional en el metabolismo oxidativo (Glatz JFC 2003).

10

Las FABP intracelulares y citoplasmáticas forman un grupo de por lo menos nueve tipos de proteína distintos. Son proteínas de 14 a 15 kDa de 126-134 aminoácidos, y se denominan tras el primer tejido de aislamiento o identificación (tabla 1) (Zimmerman A.W. 2001). Algunos tipos (L-FABP, H-FABP) se producen en más de un tejido mientras que otros (I-FABP, A-FABP, M-FABP, B-FABP) se limitan sólo a un tejido.

15

Los primeros estudios cristalográficos que se notificaron que entraban en la bibliografía fueron de I-FABP de rata recombinante (Sacchettini J.C. *et al.* 1988). Los análisis estructurales de varias FABP han revelado plegamientos tridimensionales marcadamente similares que consisten en 10 hebras  $\beta$  antiparalelas que forman un barril  $\beta$ . Este barril  $\beta$  está tapado por dos  $\alpha$ -hélices cortas dispuestas en una estructura de hélice-bucle-hélice (figura 1). La presente evidencia sugiere que la estructura de hélice-bucle-hélice junto con los giros que conectan las hebras  $\beta$  C-D y D-E, funciona como un “portal dinámico” que regula la entrada y salida de ácidos grasos de la cavidad de unión a ligando interna (Reese-Wagoner A. *et al.* 1999). En particular, la transferencia de ácidos grasos a membranas parece controlarse mediante el motivo de hélice-bucle-hélice (Liou H-L *et al.* 2002, Córscico B 2004). Esta clase de FABP, a la que también pertenece H-FABP, se ha denominado FABP activa de membrana. Éstas catalizan tanto la disociación del ácido graso de la membrana donadora como la unión a la membrana aceptora (Glatz J.F.C. 2003).

20

25

La topología de las FABP es comparable a otras dos familias de familias estructurales estrechamente relacionadas, concretamente las lipocalinas y estreptavidinas. Sin embargo, mientras que la estructura de la familia de FABP comprende una estructura de almeja de 10 láminas  $\beta$  con una tapa de hélice-bucle-hélice, las otras dos comprenden estructuras de 8 hebras  $\beta$  y ningún motivo de hélice-bucle-hélice. El barril de FABP es más aplanado y elíptico que o bien el de las lipocalinas o bien el de la estreptavidina (figura 2 y figura 3). Basándose en las similitudes estructurales, se ha sugerido que las tres familias distintas forman parte de un grupo más grande, la superfamilia estructural calicina (Flower D.R. 1993). En contraposición con las estructuras extraordinariamente similares, los miembros de la familia de FABP muestran una similitud de la secuencia de aminoácidos del 22-73%, con 39 residuos sumamente conservados (Zimmerman A.W. y Veerkamp J.H. 2002).

30

35

La presencia de uno o más puentes disulfuro es una característica única de la E-FABP, mientras que se ha mostrado que los residuos de cisteína presentes en otras moléculas FABP no participan en la formación de puentes disulfuro.

40

En general, las proteínas de las familias de lipocalina y estreptavidina son proteínas extracelulares, mientras que las FABP son intracelulares. Debido a la distribución celular, la mayoría de las FABP no contienen cisteínas que puedan participar en la formación de puentes disulfuro, siendo la única excepción la FABP epidérmica (Gutierrez-Gonzalez L.H. *et al.* 2002), aunque no se ha verificado la formación de un puente disulfuro funcional. Por otra parte, las lipocalinas y estreptavidinas se basan lo más a menudo en la formación de puentes disulfuro para su estabilidad estructural (Flower D.R 1996).

45

Además de unirse a ácidos grasos en la cavidad de las FABP, se ha mostrado que se unen sondas tales como bisANS y ANS, tal unión se ha asociado habitualmente con propiedades de un estado de glóbulo fundido de una proteína, indicando en consecuencia una estructura flexible con un alto grado de pérdida de estructura. Sin embargo, para I-FABP se verificó que la unión de bisANS y ANS tiene lugar dentro del bolsillo de esta estructura compacta bien plegada (Arighi C.N. *et al.* 2003). Poseen todas una cavidad de unión a ligando de aproximadamente 1000 Å<sup>2</sup> ubicada en la mitad superior del barril  $\beta$ .

50

Gunnarsson *et al.* (2004), Protein Engineering Design and Selection 17(3): 213-221 da a conocer una molécula de unión a hidratos de carbono (CBM4-2) como armazón.

55

Simpson *et al.* (2002), Biochemistry 41(18): 5712-5719 da a conocer una estructura en disolución de la molécula de unión a CBM4-2. Proba *et al.* (1998), Journal of Molecular Biology 275(2): 245-253 da a conocer fragmentos de anticuerpo scFv que no requieren puentes disulfuro para su estabilidad.

60

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una cadena polipeptídica nueva que forma un pliegue tridimensional particular caracterizado por un sándwich  $\beta$ . Alterando la secuencia de aminoácidos en regiones específicas del polipéptido de la invención, puede ajustarse la especificidad de la unión a ligando.

65

## ES 2 315 896 T3

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un almacén proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody) que puede unirse específicamente a uno o más ligandos, almacén que comprende un polipéptido de cadena sencilla con las siguientes propiedades estructurales:

- 5 (a) el almacén contiene 10 hebras  $\beta$  (denominadas ABCDEFGI y J) conectadas mediante regiones de bucle que determinan la especificidad de unión a ligando, en el que las hebras forman una estructura de almeja  $\beta$ ; y en el que
- 10 (b) las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -A y  $\beta$ -B;  $\beta$ -C y  $\beta$ -D;  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J se ubican en el mismo sitio de la estructura de almeja  $\beta$ ;

en el que el almacén de unión a ácidos grasos no contiene ninguna cisteína que forme puentes disulfuro y en el que el almacén no comprende un motivo de hélice-bucle-hélice.

15 En los FASTbodies descritos anteriormente, la unión a ligando específico tiene lugar mediante la interacción de una o más regiones de bucle del almacén proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody) con ese ligando específico.

Según el aspecto anterior de la invención, ventajosamente, el FASTbody según la invención puede unirse específicamente a RAS.

20 Según el aspecto anterior de la invención, ventajosamente, un FASTbody según la presente invención consiste en un polipéptido de cadena sencilla con las siguientes propiedades estructurales:

- 25 (a) el almacén contiene 10 hebras  $\beta$  (denominadas ABCDEFGHI y J) conectadas mediante regiones de bucle que determinan la especificidad de unión a ligando, en el que las hebras  $\beta$  forman juntas una estructura de almeja  $\beta$ ; y en el que
- 30 (b) las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -A y  $\beta$ -B;  $\beta$ -C y  $\beta$ -D;  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J se ubican en el mismo sitio de la estructura de almeja  $\beta$ ; en el que el almacén de unión a ácidos grasos no contiene ninguna cisteína que forme puentes disulfuro; en el que el almacén no comprende un motivo de hélice-bucle-hélice.

Según el aspecto anterior de la invención, preferentemente se sustituye el motivo de hélice-bucle-hélice de una proteína de unión a ácidos grasos por otro péptido durante la generación de los FASTbodies de la invención. Un péptido de este tipo puede ser de cualquier longitud y secuencia adecuadas. Ventajosamente, el péptido es un péptido al azar de 9 aminoácidos. Todavía más preferentemente, el péptido al azar de 9 aminoácidos es tal como se describe en la presente memoria

35 Según el aspecto anterior de la invención, la expresión “un almacén proteico de unión a ácidos grasos” (FASTbody) se refiere a un almacén según la invención tal como se describió anteriormente. Los inventores han concebido las características esenciales del almacén de unión a ligando según la invención basándose en experimentos diseñados para investigar las relaciones de estructura/función en diversas proteínas de unión a ácidos grasos. Se describe una selección de estos experimentos en los ejemplos. En particular, el almacén de unión a ácidos grasos según la invención se generó inicialmente para eliminar el motivo de hélice-bucle-hélice de la proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (A-FABP) y sustituirlo por un péptido de 9 aminoácidos aleatorizado, en particular un péptido al azar de 9 aminoácidos tal como se describe en la presente memoria.

En otra forma de realización preferida de la invención, el almacén proteico de unión a ácidos grasos según la invención comprende, preferentemente consiste en una proteína de unión a ácidos grasos FABP en la que el motivo de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia de aminoácidos. Preferentemente, el motivo de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia de aminoácidos al azar tal como se define en la presente memoria. Lo más preferentemente, el motivo de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia de 9 aminoácidos al azar. Lo más preferentemente todavía, los FASTbodies según la invención comprenden, están preferentemente constituidos por una proteína de unión a ácidos grasos de adipocitos (a-FABP) en el que el motivo de hélice-bucle-hélice se sustituye por una secuencia de aminoácidos al azar, preferentemente el motivo de hélice-bucle-hélice se sustituye por una secuencia de 9 aminoácidos al azar.

Los presentes inventores consideran que la estructura de almacén de la invención puede compararse con una estructura de anticuerpo, en la que las regiones de bucle individuales se comparan con las diferentes regiones CDR del anticuerpo. Específicamente, los inventores consideran que en el caso en el que los FASTbodies se basan en una proteína de unión a ácidos grasos en la que se sustituye el motivo de hélice-bucle-hélice por un péptido, preferentemente una secuencia de aminoácidos al azar de 9 aminoácidos, entonces la secuencia peptídica puede compararse con regiones CDR3 de cadena pesada, dado que su posición en el almacén puede adaptar variaciones significativas en longitud y estructura sin alterar el plegado global del almacén.

65 Las características esenciales de un almacén según la invención se basan en los resultados de estos experimentos. En particular, los presentes inventores han encontrado que la estructura de almeja de hebras  $\beta$  parece ser importante para determinar la integridad estructural del almacén de unión a ligando de la invención, mientras que las regiones de bucle parecen determinar la especificidad de la unión a ligando. Además, los inventores consideran que la ausencia

de cisteínas que forman puentes disulfuro en el armazón de unión a ácidos grasos (FASTbodies) según la invención es necesaria para permitir el plegado correcto de los FASTbodies en un entorno intracelular. Por tanto, los inventores consideran que la última característica es esencial para la unión de ligando específico a FASTbodies según la invención en un entorno intracelular.

5

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para generar un armazón proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody), procedimiento comprende:

(a) proporcionar una proteína de unión a ácidos grasos de cadena polipeptídica sencilla, o el ácido nucleico que la codifica; y

10

(b) aleatorizar el motivo de hélice-bucle-hélice, o el ácido nucleico que lo codifica.

Según el aspecto anterior de la invención, el término “aleatorización” (el motivo de hélice-bucle-hélice) del FASTbody de la invención se refiere al proceso de alterar la secuencia de aminoácidos del motivo de modo que la secuencia de aminoácidos resultante del motivo de hélice-bucle-hélice no es el 100% idéntico al motivo de hélice-bucle-hélice comprendido por la proteína de unión a ácidos grasos a partir de la que se genera el FASTbody de la invención.

15

La “aleatorización de una secuencia de aminoácidos” tal como se define en la presente memoria puede lograrse usando cualquier técnica adecuada que dé como resultado el cambio de por lo menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos relevante de modo que la secuencia de aminoácidos resultante no es el 100% idéntica a la misma secuencia de aminoácidos antes del “proceso de aleatorización”. Las técnicas adecuadas incluyen mutación, delección, inserción, translocación de ácidos nucleicos que codifican para algo o toda de la región relevante. Alternativamente, la aleatorización tal como se define en la presente memoria puede lograrse al nivel de aminoácidos usando técnicas similares, concretamente, mutación, delección, inserción, translocación de uno o aminoácidos que comprenden la secuencia relevante. En una realización preferida del aspecto anterior de la invención, la “aleatorización” se logra substituyendo parte o toda de la región relevante (por ejemplo parte o todo del motivo de hélice-bucle-hélice) por una segunda secuencia de aminoácidos. Tal substitución puede lograrse o bien al nivel de ácido nucleico o bien al nivel de aminoácidos. Este procedimiento se describe con mayor detalle en los ejemplos.

25

30

Los expertos en la materia apreciarán que puede generarse un FASTbody según la invención al nivel de proteína/polipéptido o al nivel de ácido nucleico. Por tanto, en el caso de que se genere el FASTbody al nivel de polipéptido, entonces se aleatoriza el motivo de hélice-bucle-hélice de una proteína/polipéptido de unión a ácidos grasos. En cambio, en el caso de que se prepara el FASTbody según la invención al nivel de ácido nucleico, entonces se aleatoriza el ácido nucleico que codifica para un motivo de hélice-bucle-hélice de una proteína de unión a ácidos grasos, tal como se define en la presente memoria.

35

Según el aspecto anterior de la invención, ventajosamente, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional (c) en la que se aleatoriza una o más regiones de bucle que conectan hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y/o J, o el ácido nucleico que las codifica, tal como se define en la presente memoria. Según esta realización preferida del aspecto anterior de la invención, preferentemente, se aleatoriza la región de bucle que conecta las hebras  $\beta$  B y E tal como se define en la presente memoria. Más ventajosamente todavía, se aleatorizan las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -E y  $\beta$ -F,  $\beta$ -G y  $\beta$ -H y  $\beta$ -I y  $\beta$ -J tal como se define en la presente memoria.

40

Según el aspecto anterior de la invención, preferentemente, la proteína de unión a ácidos grasos es proteína de unión a ácidos grasos de adipocito (FABP-A). Las fuentes de proteínas de unión a ácidos grasos adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la materia y se describen en la descripción detallada de la invención.

45

Según el aspecto anterior de la invención, el término “sustitución” (el motivo de hélice-bucle-hélice) se refiere al procedimiento de eliminar el motivo de hélice-bucle-hélice e insertar en su lugar una a secuencia peptídica adecuada.

50

Las secuencias peptídicas “adecuadas” para su utilización según el procedimiento de la invención pueden ser de cualquier longitud desde 3 aminoácidos hasta 100 aminoácidos. Ventajosamente, una secuencia peptídica adecuada es desde 3 hasta 50, o de 3 a 20 aminoácidos de longitud, más preferentemente, es desde 3 hasta 15 aminoácidos de longitud. Todavía más preferentemente, es desde 3 hasta 10 aminoácidos de longitud. Lo más preferentemente, cuando el péptido es uno que sustituye el motivo de hélice-bucle-hélice, entonces la secuencia peptídica según la invención es de preferentemente 9 aminoácidos de longitud. Además, en el caso en que el péptido funcione para substituir el bucle que conecta las hebras  $\beta$  B y E, entonces el péptido es preferentemente de 5 aminoácidos de largo o de 7 aminoácidos de largo. Ventajosamente, un péptido para su utilización según el procedimiento de la invención es una secuencia “peptídica aleatorizada” tal como se describe en la presente memoria. Los expertos en la materia apreciarán que el péptido según la etapa (b) anterior puede o no comprender elementos estructurales secundarios.

55

60

Según la presente invención, la expresión “péptido aleatorio” se refiere a una secuencia de aminoácidos de secuencia no definida. Es decir se refiere a una secuencia de aminoácidos de cualquier secuencia. Un péptido aleatorizado de este tipo puede generarse utilizando cualquier procedimiento conocido para los expertos en la materia. Ventajosamente, un péptido “aleatorio” según la presente invención se generará utilizando un sintetizador de péptidos.

65

## ES 2 315 896 T3

Todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un almacén proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody) obtenible según el procedimiento de la invención.

5 Ventajosamente, los FASTbodies según la invención comprenden, están constituidos preferentemente por, una de las proteínas de unión a ácidos grasos seleccionadas de entre el grupo constituido por: A-FABP, I-FABP, L-FABP, H-FABP, E-FABP, IL-FABP, B-FABP, M-FABP y T-FABP en las que el motivo de hélice-bucle-hélice se “aleatoriza” tal como se define en la presente memoria. Preferentemente el motivo de hélice-bucle-hélice se sustituye por una secuencia peptídica aleatoria de 9 aminoácidos descrita en la presente memoria.

10 Más ventajosamente, el FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, una de las proteínas de unión a ácidos grasos seleccionadas de entre el grupo constituido por: A-FABP, I-FABP, L-FABP, H-FABP, E-FABP, IL-FABP, B-FABP, M-FABP y T-FABP en las que el motivo de hélice-bucle-hélice se ha aleatorizado tal como se define en la presente memoria y adicionalmente una o más de las regiones de bucle que conectan una o más de las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J se “aleatorizan” tal como se describe en la presente memoria.

15 Más ventajosamente, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatorizada, preferentemente los 9 aminoácidos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan una o más de las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J se “aleatoriza” tal como se describe en la presente memoria.

20 Lo más ventajosamente, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatoria tal como se define en la presente memoria, preferentemente el péptido aleatorio de 9 aminoácidos descrito en los ejemplos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan las hebras  $\beta$  denominadas E y F se “aleatoriza” tal como se describe en la presente memoria. En otra forma de realización preferida del aspecto anterior de la invención, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatoria tal como se define en la presente memoria, preferentemente el péptido aleatorio de 9 aminoácidos descrito en los ejemplos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan las hebras  $\beta$  denominadas E y F, G y H e I y J se “aleatorizan” tal como se describe en la presente memoria.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ácido nucleico que codifica para un almacén proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody) según la invención.

35 Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende un constructo de ácido nucleico según la invención.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende un vector según la invención.

40 Así en un aspecto adicional la presente invención proporciona un procedimiento para cambiar la especificidad de unión a ligando de un almacén de unión a ácidos grasos (FASTbody) según la invención, procedimiento que comprende las etapas de:

- 45 (a) proporcionar un almacén de unión a ácidos grasos según la invención, y
- (b) aleatorizar uno o más bucles que conectan las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una biblioteca de armazones proteicos de unión a ácidos grasos (FASTbodies) según la invención.

50 Según el aspecto anterior de la invención, ventajosamente, los FASTbodies según la invención comprenden, preferentemente consisten en, una de las proteínas de unión a ácidos grasos seleccionadas de entre el grupo constituido por: A-FABP, I-FABP, L-FABP, H-FABP, E-FABP, IL-FABP, B-FABP, M-FABP y T-FABP en las que el motivo de hélice-bucle-hélice se “aleatoriza” tal como se define en la presente memoria. Preferentemente el motivo de hélice-bucle-hélice se sustituye por una secuencia peptídica aleatoria de 9 aminoácidos descrita en la presente memoria.

55 Más ventajosamente, los FASTbodies según la invención comprenden, preferentemente consisten en, una de las proteínas de unión a ácidos grasos seleccionadas de entre el grupo constituido por: A-FABP, I-FABP, L-FABP, H-FABP, E-FABP, IL-FABP, B-FABP, M-FABP y T-FABP en las que el motivo de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia de aminoácidos aleatorizada, preferentemente una secuencia peptídica aleatorizada, preferentemente una secuencia peptídica aleatoria de 9 aminoácidos descrita en la presente memoria y adicionalmente una o más de las regiones de bucle que conectan una o más de las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J se “aleatoriza” tal como se describe en la presente memoria.

65 Más ventajosamente, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatorizada, preferentemente los 9 aminoácidos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan una o más de las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J se “aleatoriza” tal como se describe en la presente memoria.

## ES 2 315 896 T3

Lo más ventajosamente, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatoria tal como se define en la presente memoria, preferentemente el péptido aleatorio de 9 aminoácidos descrito en los ejemplos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan las hebras  $\beta$  denominadas E y F se “aleatoriza” tal como se describe en la presente memoria. En una realización preferida adicional del aspecto anterior de la invención, un FASTbody según la invención comprende, preferentemente consiste en, a-FABP en la que la región de hélice-bucle-hélice se ha sustituido por una secuencia peptídica aleatoria tal como se define en la presente memoria, preferentemente el péptido aleatorio de 9 aminoácidos descrito en los ejemplos y adicionalmente las regiones de bucle que conectan las hebras  $\beta$  denominadas E y F, G y H e I y J se “aleatorizan” tal como se describe en la presente memoria.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para seleccionar un armazón de unión a ácidos grasos según la invención, armazón que puede unirse a un ligando definido, procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca de proteínas de unión a ácidos grasos (FASTbody) según la invención,
- (b) someter a prueba la capacidad de la biblioteca según la etapa (a) para unirse al ligando definido; y
- (c) seleccionar los armazones de unión a ácidos grasos según la etapa (b) que pueden unirse al ligando definido.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la unión del ligando específico a los FASTbodies según la invención está modulada por la presencia o ausencia de unión de ácidos grasos al FASTbody.

Así en un aspecto adicional, la presente invención proporciona la utilización de un ácido graso para modular la unión de ligando específico a FASTbodies según la invención.

Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona la utilización de ácido graso para monitorizar la unión de FASTbodies a uno o más ligandos específicos.

Según el aspecto de la invención mencionado anteriormente, ventajosamente la utilización comprende medir la cantidad de ácidos grasos unidos al FASTbody. Tras la unión de ligando a FASTbody la tasa de disociación de ácido graso del FASTbody se alterará, permitiendo así que se obtenga una correlación.

Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión “ácido graso” incluye dentro de su alcance derivados de ácidos grasos, homólogos, análogos y/o fragmentos de los mismos siempre que tales derivados, homólogos, análogos y/o fragmentos de los mismos presenten la actividad requerida de unión a FASTbody y la modulación consiguiente de unión de ligando específica a un FASTbody tal como se describe en la presente memoria.

Según el aspecto anterior de la invención, preferentemente el ácido graso es uno o más seleccionado de entre el grupo constituido por los siguientes: ácido láurico, ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido estérico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquídico, ácido araquidónico, ácido docosaheptaenoico o análogos fluorescentes de los anteriores. Los expertos en la materia apreciarán que esta lista no pretende ser limitativa.

Los presentes inventores consideran que los FASTbodies y/o las bibliotecas de los mismos según la invención pueden utilizarse para generar sistemas de validación adecuados para su utilización en combinación con selecciones de alto rendimiento de nuevas entidades químicas.

Así en un aspecto final, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar un candidato de fármaco potencial que puede desplazar la unión de un FASTbody según la invención al antígeno diana, procedimiento que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una biblioteca de FASTbodies según la invención,
- (b) proporcionar una muestra de uno o más candidatos de fármaco,
- (c) examinar la biblioteca para determinar la capacidad del uno o más candidatos de fármaco para desplazar la unión de uno o más FASTbodies dentro de la biblioteca según la etapa (a).

Según el aspecto anterior de la invención, las moléculas que se encuentra que desplazan la unión de uno o más FASTbodies en una biblioteca según la invención representan candidatos de fármacos potenciales. Preferentemente el procedimiento según el aspecto anterior de la invención puede efectuarse utilizando tecnología de selección de alto rendimiento. La tecnología adecuada será familiar para los expertos en la materia.

## Definiciones

El término “biblioteca” de FASTbodies según la presente invención se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta por miembros, que presentan una única secuencia de polipéptido o ácido nucleico. Hasta este punto, biblioteca es sinónimo de repertorio. Las diferencias de secuencia entre miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede adoptar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células de animal o vegetales y similares, transformadas con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada organismo o célula individual contiene solamente un miembro de la biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos.

La “aleatorización de una secuencia de aminoácidos” tal como se define en la presente memoria puede lograrse utilizando cualquier técnica adecuada que da como resultado el cambio de por lo menos un aminoácido de una secuencia de aminoácidos relevante de modo que la secuencia de aminoácidos resultante no es el 100% idéntica a aquella secuencia de aminoácidos antes del “procedimiento de aleatorización”. Las técnicas adecuadas incluyen mutación, delección, inserción, translocación de ácidos nucleicos que codifican para parte de o toda la región relevante. Alternativamente, la aleatorización tal como se define en la presente memoria puede lograrse al nivel de aminoácidos utilizando técnicas similares, concretamente, mutación, delección, inserción, translocación de uno o aminoácidos que comprenden la secuencia relevante. En una realización preferida del aspecto anterior de la invención, la “aleatorización” se logra sustituyendo parte de o toda la región relevante (por ejemplo parte de o todo el motivo de hélice-bucle-hélice de un FASTbody según la presente invención) por una segunda secuencia de aminoácidos. Tal sustitución puede lograrse o bien al nivel de ácido nucleico o bien al nivel de aminoácidos.

“Anticuerpos” se definen en la presente memoria como construcciones que utilizan la región de unión (variable) de tales anticuerpos, y otras modificaciones de anticuerpo. Así, un anticuerpo útil en la invención puede comprender anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, agregados de anticuerpo polifuncionales, o en general cualquier sustancia que comprende uno o más sitios de unión específicos de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser fragmentos tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab')<sub>2</sub> o cualquier derivado de los mismos, tales como una fragmentos Fv de cadena sencilla. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser no recombinantes, recombinantes o humanizados. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, etcétera. Además, agregados, polímeros, derivados y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos pueden utilizarse cuando sea apropiado.

Según la presente invención, la expresión “péptido aleatorizado” se refiere a una secuencia de aminoácidos de secuencia no definida. Es decir, se refiere a una secuencia de aminoácidos de cualquier secuencia. Un péptido aleatorizado de este tipo puede generarse utilizando cualquier procedimiento conocido para los expertos en la materia. Ventajosamente, un péptido “aleatorio” según la presente invención se generará utilizando un sintetizador de péptidos.

La CDR (región determinante de la complementariedad) de un dominio variable de cadena pesada y ligera de molécula de inmunoglobulina describe aquellos residuos de aminoácido que no son residuos de región de entramado y que están contenidos en bucles hipervariables de las regiones variables. Estos bucles hipervariables están directamente implicados en la interacción de la inmunoglobulina con el ligando. Los residuos de estos bucles tienden a mostrar un grado inferior de conservación que los de la región de entramado.

Intracelular significa dentro de una célula. La célula puede ser cualquier célula, procariota o eucariota, y se selecciona preferentemente de entre el grupo constituido por una célula bacteriana, una célula de levadura y una célula eucariota superior. Las más preferidas son células de levadura y células de mamífero. Además el término “intracelular” se refiere a entornos que se asemejan a o imitan un entorno intracelular. Así, “intracelular” puede referirse a un entorno que no está dentro de la célula, sino que es *in vitro*.

Unión específica en el contexto de la presente invención, significa que la interacción entre el FASTbody y el ligando es específica, es decir, en el caso de que varias moléculas se presentan al FASTbody, el último solamente se unirá a una o a pocas de aquellas moléculas presentadas. Ventajosamente, la interacción FASTbody-ligando será de alta afinidad. La interacción entre FASTbody y ligando estará mediada por interacciones no covalentes tales como enlaces de hidrógeno y Van der Waals. Generalmente, la interacción se producirá en las regiones de bucle del FASTbody.

## Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una representación esquemática de la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito. Las 10 hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I, J están representadas en cuadrados, mientras que el motivo de hélice-bucle-hélice que conecta hebra  $\beta$  A y B se muestra como cilindros. Los bucles que conectan los elementos estructurales secundarios están representados en líneas finas.

La figura 2 muestra una representación tridimensional de la estructura de proteína de unión a ácidos grasos de adipocito complejada con sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno creada utilizando el programa visualizador Swiss-PDB (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Las coordenadas (2ANS) se tomaron de PDB.

## ES 2 315 896 T3

La figura 3 muestra la comparación de secuencias entre proteína de unión a ácidos grasos de adipocito de ser humano y ratón, mostrándose los elementos estructurales secundarios. Las regiones de hélice se muestran como cuadrados y hebras b se muestran como líneas que terminan con una flecha, las regiones de bucle se indican con la letra t.

5 La figura 4 muestra la secuencia de gen transcrita de proteína de unión a ácidos grasos de adipocito humana de tipo natural, derivada del Genbank con número de registro: NM 001442. La secuencia traducida está destacada en amarillo.

10 La figura 5 muestra una comparación de secuencias entre proteína de unión a ácidos grasos de adipocito humana de tipo natural y la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito recombinante modificada clonada en el vector fagémido pHEN2. En la primera línea se da la secuencia de aminoácidos de tipo natural de A-FABP con elementos estructurales secundarios (cursiva indica hélice, azul indica lámina y negro subrayado residuos de bucle).

15 La figura 6 muestra la comparación de secuencias entre la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito recombinante modificada en pHEN2 antes y después de eliminar la región de hélice-bucle-hélice. En la variante sin hélice de la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito los sitios de reconocimiento de enzima de restricción únicos para KpnI, XhoI y BspEI se añadieron tal como se detalla en el ejemplo 1.

20 La figura 7 muestra la comparación de secuencias entre la variante sin hélice de la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito y la primera biblioteca de FASTbody en la que región de hélice-bucle-hélice de la proteína de unión a ácidos grasos de adipocito se sustituyó por un inserto de 9 aminoácidos aleatorizado. En el procedimiento de aleatorización se utiliza el codón NNK.

25 La figura 8 muestra los resultados de ELISA obtenidos con 4 agentes de unión a FASTbody seleccionados frente a RAS. En el ELISA los pocillos se recubrieron con 50 ng de cada uno de los antígenos indicados (RAS, ubiquitina, leche desnatada y BSA). Para evitar la unión a la superficie de plástico libre se bloquearon los pocillos añadiendo leche desnatada en polvo al 3% en PBS, seguido por incubación con 50  $\mu$ l de un sobrenadante de fago de los agentes de unión a FASTbody individuales (2-4-F, 3-12-F, 3-11-E y 1-4-H). Se detectó la unión a FASTbody haciendo reaccionar con un anticuerpo monoclonal frente a la partícula de fago seguido por el desarrollo con OPD. Los tres agentes de unión 2-4-F, 3-12-F y 3-11-E se unen específicamente a RAS mientras que 1-4-H no muestra unión significativa.

30 La figura 9 muestra los resultados de ELISA obtenidos con los mismos 4 agentes de unión a FASTbody seleccionados tal como se muestra en la figura 8. En el ELISA los pocillos se recubrieron con 50 ng de cada uno de los antígenos indicados (RAS, ubiquitina, leche desnatada y BSA). Para evitar la unión a la superficie de plástico libre se bloquearon los pocillos añadiendo BSA al 2% en PBS, seguido por incubación con 50  $\mu$ l de sobrenadante de fago de los agentes de unión a FASTbody individuales (2-4-F, 3-12-F, 3-11-E y 1-4-H). Se conoce que BSA se une fuertemente a ácidos grasos, por tanto cualquier ácido graso unido a las estructuras del FASTbody se desplazarían bloqueando e incubando los FASTbodies en presencia de BSA. Se detectó la unión a FASTbody haciendo reaccionar con un anticuerpo monoclonal frente a la partícula de fago seguido por el desarrollo con OPD. FASTbodies de los clones 2-4-F y 3-11-E no muestran una unión significativa a RAS en comparación con el antecedente, indicando así que el reconocimiento de RAS de estos FASTbodies depende de los ácidos grasos que están presentes en el armazón de FASTbody. 3-12-F conserva algo de la especificidad de unión hacia RAS.

45 La figura 10 muestra parte de la secuencia del agente de unión 3-11-E seleccionado para la unión frente a la proteína RAS. Solamente se muestra parte de la secuencia de alrededor de la secuencia 9 de aminoácidos. El sitio de restricción NcoI está ubicado en el codón de iniciación para los FASTbodies, mientras que XhoI y BspEI están ubicados en cualquier sitio del inserto de 9 aminoácidos. Los 9 aminoácidos se muestran en cursiva.

50 La figura 11 muestra una representación esquemática de las construcciones de biblioteca basándose en el agente de unión 3-11-E. Tal como se resume en el ejemplo 3. Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando el agente de unión 3-11-E en pHEN2 como molde. Una utilizando el oligonucleótido que ceba en la secuencia vector corriente arriba del codón de iniciación del FASTbody (FABP64S) junto con un oligonucleótido inmediatamente delante del bucle que conecta la hebra b E y F, y la otra utilizando un oligonucleótido que ceba en la secuencia vector corriente arriba del extremo del FASTbody (FABP545AS) junto con dos oligonucleótidos diferentes utilizados para insertar una secuencia aleatoria de 5 y 7 aminoácidos respectivamente en el bucle que conecta la hebra b E y F. Se utilizó una amplificación mediante PCR secundaria para ensamblar los dos fragmentos antes del clonado de los productos de PCR en los sitios PstI y NotI.

60 La figura 12 muestra los resultados de ELISA de un conjunto seleccionado de agentes de unión obtenidos a partir de las dos bibliotecas de FASTbodies construidas utilizando el agente de unión 3-11-E seleccionado anteriormente frente a RAS como molde. Se aleatorizaron las dos bibliotecas tal como se mostró anteriormente en el ejemplo 3.

65 Cinco de los clones positivos obtenidos después de la selección de las bibliotecas de FASTbody generadas utilizando 3-11-E como molde y el agente de unión 3-11-E se sometieron a prueba en un ELISA diseñado para destacar la importancia de añadir ácidos grasos libres a los FASTbodies. Se permitió a los agentes de unión unirse a leche desnatada en polvo sola, Ras bloqueada con leche desnatada en polvo, leche desnatada en polvo y oleato, RAS con oleato y bloqueada con leche desnatada en polvo, leche desnatada en polvo con oleato y oleato presente en todas las etapas de lavado e incubación, Ras con oleato y bloqueada con leche desnatada en polvo y oleato presente en todas las etapas de lavado e incubación.

Mientras que todos los clones de las nuevas bibliotecas generaron agentes de unión con unión aumentada a RAS, la influencia del oleato presente solamente en la etapa de recubrimiento o en todas las demás etapas de lavado e incubación varió entre los clones.

5 La figura 13 muestra la secuencias de los 5 agentes de unión seleccionados a partir de las bibliotecas de FASTbodies basándose en el agente de unión 3-11-E con aleatorización del bucle que conecta hebra b E y F.

Se marcan los residuos aleatorizados como gris en el nivel de ADN. Todos los clones presentan secuencias diferentes estableciendo el potencial de generar diversas series de agentes de unión utilizando el armazón FASTbody. Además se identificaron los agentes de unión con tanto 5 como 7 aminoácidos aleatorizados estableciendo la flexibilidad de las regiones de bucle para alojar secuencia bucle de longitud variable.

La figura 14 muestra un vector pET11d modificado en el que la clonación en NcoI y NotI permite la expresión de una proteína de fusión con una etiqueta myc e His añadida al extremo C Terminal de la proteína de fusión.

La figura 15 muestra una representación esquemática del vector de expresión permitiendo la expresión intracelular de los FASTbodies en *Mucor*.

La figura 16 muestra la secuencia detallada del vector pEUKA7-kan.

La figura 17 muestra la expresión intracelular del agente de unión 3-11-E 89-8-E de RAS expresado a partir del vector pEUKA7-kan. Como control se hicieron crecer los KFA143 (Appel *et al.* 2004) en condiciones aerobias y anaerobias.

25 La figura 18 muestra esquemáticamente el ensamblaje del fragmento de gen sintético para la creación de la biblioteca de FASTbodies aleatorizada total tal como se describe en el ejemplo 7.

La figura 19 muestra un experimento de ELISA en FASTbodies de una biblioteca aleatorizada total. Se realizó el ELISA tal como se describe en el ejemplo 8 y los resultados se dan como absorbancia a 490 nm. Se marcan los clones positivos con sombreado gris.

### Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado tal como se entiende comúnmente por un experto en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, técnicas de hibridación y bioquímica). Se utilizan técnicas convencionales para los procedimientos moleculares, genéticos y bioquímicos (véase generalmente, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. y Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4ª Ed, John Wiley & Sons, Inc. que se incorporan a la presente memoria como referencia) y procedimientos químicos.

#### Proteínas de unión a ácidos grasos

Pueden generarse armazones de unión a ácidos grasos (FASTbodies) según la presente invención a partir de una o más proteínas de unión a ácidos grasos.

Tales proteínas de unión a ácidos grasos pueden clasificarse tal como se muestra en la Tabla 1.

Tejido	Nombre de FABP	Abreviatura de FABP
Hígado, intestino, riñón, estómago	Hepática	L
Intestino, estómago	Intestinal	I
Corazón, riñón, músculo esquelético, aorta, glándula suprarrenal, placenta, cerebro, testículos, ovario, pulmón, glándula mamaria, estómago	Cardiaca	H
Tejido adiposo	De adipocito	A
Piel, cerebro, cristalino, capilares, endotelio, retina	Epidérmica	E
Intestino, ovario, glándulas suprarrenales, estómago	Ileal	IL
Cerebro	Cerebral	B
Sistema nervioso periférico	Mielínica	M
Testículo	Testicular	T

## ES 2 315 896 T3

En una realización preferida de la invención, se generan FASTbodies según la invención a partir de A-FABP (proteína de unión a ácidos grasos de adipocito).

### 5 *Características estructurales de las proteínas de unión a ácidos grasos*

Las proteínas de unión a ácidos grasos a partir de las cuales puede generarse un FASTbody según la presente invención comprenden una gran región de hebra  $\beta$  que forma una estructura de almeja  $\beta$  tal como se define en la presente memoria y una pequeña región helicoidal. Juntas estas estructuras (cuyas características se describen a continuación) crean un espacio de unión de ácido graso específico.

Los primeros estudios cristalográficos notificados que entraron en la bibliografía fueron de I-FABP de rata recombinante. Los análisis estructurales de varios FABP han revelado plegamientos tridimensionales notablemente similares constituidos por 10 hebras  $\beta$  antiparalelas que forman un cilindro  $\beta$  (Zanotti G. 1999). Este cilindro  $\beta$  está tapado por  $\beta$ dos  $\alpha$ -hélices cortas dispuestas en una estructura de hélice-bucle-hélice (figura 1). La presente evidencia sugiere que la estructura de hélice-bucle-hélice junto con las vueltas que conectan las hebras  $\beta$  C-D y D-E, funcionan como un “portal dinámico” que regula la entrada y la salida de ácido graso de la cavidad de unión a ligando interna. En particular, la transferencia de ácidos grasos a membranas parece controlarse mediante el motivo de hélice-bucle-hélice (Liou H-L *et al* 2002, Córscico B 2004)). Esta clase de FABP, a la que también pertenece H-FABP, se ha denominado FABP activas de membrana. Éstos catalizan tanto la disociación de la membrana donadora como la unión a la membrana aceptora (Glatz J.F.C. 2003).

La topología de las FABP es comparable otras dos familias de familias estructurales estrechamente relacionadas, concretamente las lipocalinas y las estreptavidinas. Sin embargo mientras que la estructura de la familia de FABP comprende una estructura de almeja de 10 láminas  $\beta$  con una tapa de hélice-bucle-hélice, las otras dos comprenden estructuras de 8 hebras  $\beta$  y ningún motivo de hélice-bucle-hélice. El cilindro de FABP es más plano y elíptico que cualquiera de las lipocalinas o estreptavidina. Basándose en las similitudes estructurales, se ha sugerido que las tres familias distintas forman parte de un grupo mayor, la superfamilia estructural calicina (Flower D.R. 1993). A diferencia de estructuras notablemente similares, los miembros de la familia de FABP muestran una similitud de secuencia de aminoácidos del 22-73%, con 39 residuos sumamente conservados.

Algunos detalles de estas topologías estructurales se presentan a continuación:

#### 35 (a) *Hebras $\beta$*

En la estructura de hebra beta ( $\beta$ ), el segmento de polipéptido adopta una conformación extendida, en la que los ángulos phi y psi están alrededor de  $-120^\circ$  y  $+120^\circ$  respectivamente. Los grupos R de los aminoácidos alternan en ubicación con respecto al plano definido por el esqueleto de tal modo que cada segundo está ubicado en un lado del plano y cada segundo alterno está en el lado opuesto del plano.

#### (b) *$\alpha$ -Hélice*

En la estructura de alfa hélice, el esqueleto de polipéptido está dispuesto en una hélice helicoidal que presenta aproximadamente 3,6 residuos por vuelta. Los grupos R del aminoácido se extienden hacia fuera de la hélice compacta formada del esqueleto. En una estructura de este tipo la unidad de repetición que consiste en una única vuelta completa de la hélice, se extiende aproximadamente 0,54 nm a lo largo del eje longitudinal. La alfa hélice es la disposición más simple que puede adoptarse por un polipéptido teniendo en consideración la limitación impuesta por los enlaces peptídicos planares.

#### (c) *Estructura de almeja $\beta$*

La topología de almeja  $\beta$  consiste en dos láminas  $\beta$  antiparalelas de cinco hebras que rodean una gran cavidad cargada de disolvente dentro de la cual se une el ligando. Esta topología de almeja  $\beta$ . Esta topología de almeja  $\beta$  está presente en todos los miembros de la familia de la proteína de unión a ácidos grasos y es una característica esencial del armazón proteico de unión a ácidos grasos (FASTbodies) según la invención.

#### 60 (a) *Motivo de hélice-bucle-hélice*

Las proteínas de unión a ácidos grasos comprenden dos  $\alpha$ -hélices que unen hebras beta A y B. Es decir, las hebras  $\beta$  A y B se unen mediante un motivo de hélice-bucle-hélice. El armazón proteico de unión a ácidos grasos (FASTbodies) según la invención conserva esta característica en ciertas formas de realización. Los presentes inventores consideran que la presencia del motivo de hélice-bucle-hélice no es necesaria con el fin de mantener la integridad de la cavidad de unión a ácidos grasos, pero puede servir para regular la afinidad de unión a ácidos grasos (Cistola, D. P 1996).

*Armazones de unión a ácidos grasos según la invención*

En un primer aspecto la presente invención proporciona un armazón proteico de unión a ácidos grasos (FASTbody) que puede unirse específicamente a uno o más ligandos, armazón que comprende un polipéptido de cadena sencilla con las siguientes propiedades estructurales:

- (a) el armazón contiene 10 hebras  $\beta$  (denominadas ABCDEFGHI y J) conectadas mediante regiones de bucle que determinan la especificidad de unión a ligando, en el que las hebras  $\beta$  forman juntas una estructura de almeja  $\beta$ ; y en el que
- (b) las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -A y  $\beta$ -B;  $\beta$ -C y  $\beta$ -D;  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J se ubican en el mismo sitio de la estructura de almeja  $\beta$ ; en las que el armazón de unión a ácidos grasos no contiene ninguna cisteína que forme puentes disulfuro; en las que el armazón no comprende un motivo de hélice-bucle-hélice.

*Características de los armazones proteicos de unión a ácidos grasos según la invención*

Los presentes inventores han estudiado las relaciones de estructura/función en miembros de la familia de la proteína de unión a ácidos grasos. Han utilizado la información obtenida para diseñar un armazón. De manera importante, un armazón de este tipo consiste en regiones de bucle que pueden interactuar de manera específica con uno o más ligandos. Además han utilizado esta información para examinar la influencia de los ácidos grasos asociados con la estructura de armazón y la influencia de dichos ácidos grasos en la unión de ligandos. Algunas de las consideraciones estructurales tomadas en consideración para diseñar un armazón de unión a ácidos grasos (FASTbody), armazón según la presente invención, se enumeran a continuación:

*(a) Flexibilidad estructural de las vueltas*

Cuando la estructura de la proteína de unión a ácido graso del parásito platelminto *Echinococcus granulosus* (Eg-FABP1) se compara con otro miembro de la familia estructural la proteína de mielina P2, las diferencias estructurales principales aparecen en las vueltas antes y después de la hebra  $\beta$  H (Jakobsson E. 2003). A pesar de las diferencias estructurales en las regiones de vuelta alrededor de la hebra  $\beta$  H, la conformación y ubicación de esta hebra son idénticas en las dos proteínas, sugiriendo por tanto que se permite un cierto grado de variación de secuencia en regiones de vuelta, aunque todavía conservando las características estructurales globales.

Anteriormente, estudios han investigado la influencia de mutar aminoácidos individuales en I-FABP. Se seleccionaron los residuos basándose en una probable influencia en el plegamiento o la estabilidad. Leu64 ubicada en el bucle que conecta hebra  $\beta$  D y hebra  $\beta$  E hace numerosos contactos con residuos en otras hebras, y mutantes en el residuo 64 mostraron una disminución notable en la estabilidad (Rajabzadeh M. 2003). Aunque esto puede ser cierto para determinados residuos clave conservados, se ha examinado un gran número de mutantes de otras proteínas FABP y muestran estabilidades similares o moderadamente disminuidas con una conservación de las características estructurales globales (Zimmerman A.W., *et al.* 1999).

La alta flexibilidad que es necesaria para una captación y distribución apropiadas de ácidos grasos, implica principalmente flexibilidad de la región de hélice-bucle-hélice, mientras que se conserva la estabilidad conformacional global de la estructura de almeja  $\beta$ , tal como se ha mostrado para las I-FABP y L-FABP (Constantine K.L. *et al.* 1998; Arighi C.N. 2003; Córscico B. 2004).

*(b) Estabilidad de proteínas de unión a ácidos grasos (FABP)*

La estructura de FABP global muestra estabilidad conformacional significativa, aunque existe una extensión significativa de estabilidades entre los miembros individuales. La estabilidad medida mediante desnaturalización de urea muestra que H-FABP es la más estable con un punto medio de desnaturalización a urea 5,95 M, que va seguido por A-FABP (5,36 M), I-FABP (5,20 M), B-FABP (4,07 M), II-FABP (3,78 M), M-FABP (3,00 M), E-FABP (2,57 M) y L-FABP (1,85 M) (Zimmerman A.W. 2001). Esta estabilidad conformacional no se correlaciona con la afinidad para unión a ligando.

*I-FABP sin hélice*

Estudios anteriores produjeron una variante sin hélice de la I-FABP de rata con el fin de examinar el papel del motivo de hélice-bucle-hélice en la unión a ligando (Wu F., *et al.* 2001). En la variante sin hélice el motivo de hélice-bucle-hélice se sustituyó por un ligador de ser-gly. El dicroísmo circular y los espectros de RMN indicaron que esta variante de I-FABP presenta un alto contenido en lámina  $\beta$  y una topología de almeja  $\beta$  similar a la de la proteína de tipo natural (Steele R.A. *et al.* 1998). La conformación del esqueleto del variante sin hélice es casi superponible con el dominio de lámina  $\beta$  de I-FABP de tipo natural. La estabilidad de la variante sin hélice se reduce ligeramente tras

la desnaturalización con tratamiento con guanidina. Las tasas de asociaciones a ligando para la variante sin hélice y la proteína de tipo natural eran comparables, pero las tasas de disociación eran 16 veces inferiores para la proteína de tipo natural. La presente invención ha mostrado que tras la unión de un ligando a los FASTbodies de la presente invención, se alterará la tasa de disociación de ácidos grasos que se unen a los FASTbodies, permitiendo así una correlación entre la unión a ligando y la tasa de disociación de ácidos grasos que va a realizarse. Estos datos indican que la  $\alpha$ -hélice de I-FABP no es necesaria para mantener la integridad de la cavidad de unión a ácidos grasos pero puede servir para regular la afinidad de unión a ácidos grasos (Cistola D.P. 1996). Además estudios de transferencia de ácido graso mostraron que en ausencia del dominio de  $\alpha$ -hélice, no se produce transferencia colisional efectiva de ácidos grasos a membranas de fosfolípidos, indicando que la región de  $\alpha$ -hélice de FABP es esencial para la interacción con membranas.

Para varias mutaciones de punto único así como H-FABP y de A-FABP quimérica se han observado conservación de la estructura secundaria global (Richier G.V. *et al* 1998, Liou H-L 2002) lo que refuerza adicionalmente la idea de que la variación de secuencia pueda acomodarse sin destruir el plegamiento global de la FABP.

#### *Bibliotecas de FASTbodies según la presente invención*

Los presentes inventores utilizaron la información obtenida estudiando las relaciones de estructura/función de proteínas de unión a ácidos grasos descritas anteriormente con el fin de diseñar un armazón de FABP según la invención. Entonces se crearon bibliotecas de tales moléculas por los presentes inventores con el fin de seleccionar FASTbodies según la presente invención que muestran una o más especificidades de unión a ligando deseadas. Preferentemente el uno o más ligandos es RAS.

Un ejemplo de una estrategia utilizada en la generación de una biblioteca de FASTbodies específica de ligando según la presente invención se proporciona a continuación:

En primer lugar la región hélice-bucle-hélice, se sustituyó por un péptido de 9 aminoácidos aleatorio. Se seleccionó la biblioteca en RAS y agentes de unión obtenidos. En la siguiente etapa se seleccionó uno de los agentes de unión aislados seleccionando en RAS como para aleatorización del bucle que conecta hebra  $\beta$  E y F, tal como se define en la presente memoria. Se crearon dos bibliotecas diferentes, una que presentaba 5 aminoácidos aleatorizados sustituyendo el bucle y una que presentaba 7 aminoácidos aleatorizados sustituyendo el bucle. De nuevo se seleccionaron las nuevas bibliotecas para unión hacia RAS. Se aislaron varios clones con afinidad de unión aumentada según se consideró a partir de experimentos de ELISA.

Se dio un resultado imprevisto cuando se cambió el reactivo de bloqueo del utilizado normalmente leche desnatada en polvo al 2 % en PBS a BSA al 2% en PBS. El cambio en el reactivo de bloqueo dio como resultado una señal disminuida para algunos de los agentes de unión aislados hacia RAS. BSA une y transporta ácidos grasos en el suero, consecuentemente BSA presenta una afinidad significativa para ácidos grasos. En estudios anteriores se ha mostrado que la afinidad de unión de un variante sin hélice de I-FABP presenta una afinidad de unión reducida de 20-100 hacia ácidos grasos.

Dado que existe una reducción similar de afinidad de unión para ácidos grasos para el presente armazón modificado mediante ingeniería genética construido en la A-FABP, los resultados anteriores indicaron que la presencia de ácidos grasos en el armazón seleccionado puede regular la unión de armazón individual a sus dianas.

Basándose en esta nueva observación potencialmente pueden aislarse agentes de unión regulables hacia dianas predefinidas. Además puede utilizarse una dependencia de los ácidos grasos presentes en el FASTbody para medir la unión de ligando al FASTbody midiendo la unión a ácidos grasos del FASTbody.

Siguiendo la prueba del concepto descrita anteriormente se ha construido una nueva biblioteca en la que la región de hélice-bucle-hélice se sustituye por el péptido de 9 aminoácidos aleatorio, descrito anteriormente, junto con aleatorización de las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J.

La biblioteca resultante se ha seleccionado frente a diversas dianas, incluyendo RAS, y se ha obtenido una serie diversa de agentes de unión.

#### *Preparación de bibliotecas de FASTbody según la invención*

El término "biblioteca" de FASTbodies según la presente invención se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La biblioteca está compuesta por elementos, que presentan una única secuencia de polipéptido o ácido nucleico. Hasta este punto, *biblioteca* es sinónimo de *repertorio*. Las diferencias de secuencia entre los elementos de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca. La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una biblioteca de ácidos nucleicos. Preferentemente, cada organismo o célula individual contiene solamente un elemento de la biblioteca. De manera ventajosa, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos.

## ES 2 315 896 T3

Pueden prepararse bibliotecas de (armazones proteicos de unión a ácidos grasos) FASTbodies según la presente invención utilizado cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica.

### 5 *Sistemas de vector de biblioteca*

En la técnica es conocida una variedad de sistemas de selección que son adecuados para su utilización en la presente invención. Se describen a continuación ejemplos de tales sistemas.

10 Los sistemas de expresión de bacteriófago lambda pueden seleccionarse directamente como placas de bacteriófagos o como colonias de lisógenos, ambos tal como se describieron anteriormente y (Huse *et al.* (1989) *Science*, 246: 1275; Caton y Koprowski (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87; Mullinax *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 8095; Persson *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 2432) y son de utilidad en la invención. Mientras que tales sistemas de expresión pueden utilizarse para seleccionar hasta  $10^6$  elementos diferentes de una biblioteca, 15 realmente no son adecuados para seleccionar grandes números (superiores a  $10^6$ ).

De particular utilidad en la construcción de bibliotecas son sistemas de presentación de selección, que permiten que un ácido nucleico se una al polipéptido que expresa. Tal como se utiliza en la presente memoria, un sistema de 20 presentación de selección es un sistema que permite la selección, mediante medios de presentación adecuados, de los elementos individuales de la biblioteca mediante la unión de ligandos genéricos y/o diana.

### *Bibliotecas de presentación en fago*

25 En la técnica son conocidos protocolos de selección para aislar elementos deseados de bibliotecas grandes, tal como se tipifica por técnicas de presentación en fago. Tales sistemas, en los que se presentan diversas secuencias peptídicas sobre la superficie de bacteriófago filamentoso (Scott y Smith (1990) *Science*, 249: 386), han demostrado ser útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpo (y las secuencias de nucleótidos que codifican para ellos) para la selección y amplificación *in vitro* de fragmentos de anticuerpo específicos que se unen a un antígeno diana 30 (McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047). Las secuencias de nucleótidos que codifican para las regiones  $V_H$  y  $V_L$  se unen a los fragmentos génicos que codifican para las señales líder que las dirigen al espacio periplásmico de *E. coli* y como resultado los fragmentos de anticuerpo resultantes se presentan sobre la superficie del bacteriófago, normalmente como fusiones a proteínas de recubrimiento de bacteriófago (por ejemplo, pIII o pVIII). De manera alternativa, se presentan fragmentos de anticuerpo de manera externa sobre cápsides de fago lambda (*phagebodies*). 35 Una ventaja de los sistemas de presentación basados en fagos es que, debido a que son sistemas biológicos, pueden amplificarse los elementos de la biblioteca seleccionados simplemente cultivando el fago que contienen el elemento de biblioteca seleccionado en células bacterianas. Además, puesto que la secuencia de nucleótidos que codifica para el elemento de biblioteca de polipéptidos está contenida en un vector fagémido o de fago, la secuenciación, expresión y posterior manipulación genética es relativamente sencilla. 40

En la técnica son conocidos bien procedimientos para la construcción de bibliotecas de presentación de anticuerpos en bacteriófagos y bibliotecas de expresión en fago lambda (McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348: 552; Kang *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4363; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Lowman *et al.* (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Burton *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 10134; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133; Chang *et al.* (1991) *J. Immunol.*, 147: 3610; Breitling *et al.* (1991) *Gene*, 104: 147; Marks *et al.* (1991) citado anteriormente; Barbas *et al.* (1992) citado anteriormente; Hawkins y Winter (1992) *J. Immunol.*, 22: 867; Marks *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 16007; Lerner *et al.* (1992) *Science*, 258: 1313, incorporado a la presente memoria como referencia). Pueden utilizarse técnicas similares para la generación de bibliotecas de FASTbody según la presente invención. 45

Un enfoque particularmente ventajoso ha sido la utilización de bibliotecas en fago de scFv (Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5879-5883; Chaudhary *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 1066-1070; McCafferty *et al.* (1990) citado anteriormente; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Chiswell *et al.* (1992) *Trends Biotech.*, 10: 80; Marks *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.*, 267). Se han descrito 55 diversas formas de realización de bibliotecas de scFv presentadas en proteínas de recubrimiento de bacteriófago. También se conocen mejoras de enfoque de presentación en fago, por ejemplo tal como se describe en los documentos WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council *et al.*) y documento WO97/08320 (Morphosys), que se incorporan a la presente memoria como referencia.

60 Otros sistemas para generar bibliotecas de polipéptidos implican la utilización de maquinaria enzimática libre de células para la síntesis *in vitro* de los elementos de la biblioteca. En un procedimiento, se seleccionan moléculas de ARN mediante rondas alternas de selección frente a un ligando diana y amplificación por PCR (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249: 505; Ellington y Szostak (1990) *Nature*, 346: 818). Puede usarse una técnica similar para identificar secuencias de ADN que se unen a un factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen y Bach (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 3203; Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257: 635; documentos WO92/05258 y WO29/14843). De un modo similar, puede usarse traducción *in vitro* para sintetizar polipéptidos como un procedimiento para generar 65 bibliotecas grandes. Estos procedimientos que generalmente comprenden complejos de polisomas estabilizados, se describen adicionalmente en los documentos WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003, WO91/02076, WO91/05058

y WO29/02536. Los sistemas de presentación alternativos que no se basan en fagos, tales como los dados a conocer en los documentos WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) utilizan los polisomas para presentar polipéptidos para la selección.

5 Aún otra categoría de técnicas implica la selección de repertorios en compartimentos artificiales, que permiten la unión de un gen con su producto génico. Por ejemplo, un sistema de selección en el que los ácidos nucleicos que codifican para productos génicos deseables, puede seleccionarse en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite se describe en los documentos WO99/02671, WO00/40712 y Tawfik & Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6. Los elementos genéticos que codifican para un producto génico que presenta una actividad deseada se compartimentan en microcápsulas y entonces se transcriben y/o traducen para producir sus productos génicos respectivos (ARN o proteína) dentro de las microcápsulas. Posteriormente se clasifican los elementos genéticos que producen el producto génico que presenta la actividad deseada. Este enfoque selecciona productos génicos de interés detectando la actividad deseada mediante una variedad de medios.

15

### *Construcción de bibliotecas*

Pueden construirse bibliotecas destinadas para su utilización en la selección usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo tal como se expuso anteriormente, o pueden adquirirse de fuentes comerciales. Una vez se elige un sistema de vector y se clonan una o más secuencias que codifican para polipéptidos de interés en el vector de biblioteca, puede generarse diversidad dentro de las moléculas clonadas llevando a cabo mutagénesis antes de la expresión; de manera alternativa, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, tal como se describió anteriormente, antes de la mutagénesis y se realizan rondas adicionales de selección. La mutagénesis de secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo mediante procedimientos moleculares convencionales. Es de particular utilidad la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) Methods Enzymol., 155: 335, incorporado a la presente memoria como referencia). La PCR, que utiliza múltiples ciclos de replicación de ADN catalizada por una ADN polimerasa dependiente de ADN, termoes estable para amplificar la secuencia diana de interés, se conoce bien en la materia. La construcción de diversas bibliotecas de anticuerpos se ha tratado en Winter *et al.* (1994) Ann. Rev. Immunology 12, 433-55, y referencias citadas en el mismo.

30

La PCR se realiza utilizando ADN de molde (por lo menos 1 fg; de manera más útil, 1-1000 ng) y por lo menos 25 pmol de cebadores de oligonucleótido; puede ser ventajoso utilizar una cantidad mayor de cebador cuando el conjunto de cebadores sea fuertemente homogéneo, ya que cada secuencia está representada solamente por una pequeña fracción de las moléculas del conjunto, y las cantidades se vuelven limitativas en los últimos ciclos de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye: 2  $\mu$ l de ADN, 25 pmol de cebador de oligonucleótido, 2,5  $\mu$ l de 10X tampón de PCR 1 (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4  $\mu$ l de dNTP 1,25  $\mu$ M, 0,15  $\mu$ l (ó 2,5 unidades) de Taq ADN polimerasa (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desionizada hasta un volumen total de 25  $\mu$ l. Se recubre con aceite mineral y se realiza la PCR utilizando un ciclador térmico programable. La duración y temperatura de cada etapa de un ciclo de PCR, así como el número de ciclos, se ajusta según los requisitos de rigurosidad vigentes. Los tiempos y la temperatura de apareamiento se determinan tanto mediante la eficacia con la que se espera que un cebador se aparee con un molde como el grado de apareamiento erróneo que va a tolerarse; obviamente, cuando se amplifican y se someten a mutagénesis moléculas de ácido nucleico, se requiere apareamiento erróneo, por lo menos en la primera ronda de síntesis. La capacidad para optimizar la rigurosidad de las condiciones de apareamiento del cebador resulta evidente para un experto en la materia. Se utiliza una temperatura de apareamiento de entre 30°C y 72°C. La desnaturalización inicial de las moléculas de molde se produce normalmente a entre 92°C y 99°C durante 4 minutos, seguido por 20-40 ciclos que consisten en desnaturalización (94-99°C durante 15 segundos a 1 minuto), apareamiento (temperatura determinada tal como se trató anteriormente; 1-2 minutos), y extensión (72°C durante 1-5 minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado). La extensión final es generalmente durante 4 minutos a 72°C, y puede ir seguida por una etapa indefinida (0-24 horas) a 4°C.

50

### *Ligandos de FASTbody*

Los FASTbodies según la presente invención que presentan una especificidad de unión a ligando definida pueden construirse y/o seleccionarse a partir de bibliotecas tal como se describe en la presente memoria. Tales FASTbodies pueden generarse utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria.

55

Los ligandos de FASTbody pueden ser sintéticos o producirse de manera natural. Los ligandos que se producen de manera natural incluyen anticuerpos, péptidos, otras proteínas incluyendo por ejemplo hormonas y moléculas de señalización y ácidos grasos.

60

Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión "ácido graso" incluye dentro de su alcance derivados, homólogos, análogos de ácido graso y/o fragmentos de los mismos siempre que tales derivados, homólogos, análogos y/o fragmentos de los mismos presenten la actividad requerida de unión a FASTbody y la correspondiente modulación de unión específica de ligando a un FASTbody tal como se describe en la presente memoria.

65

En una realización preferida del aspecto anterior de la invención, el FASTbody según la presente invención puede unirse de manera específica a RAS.

*Preparación de anticuerpos*

Pueden utilizarse o bien proteínas recombinantes o bien las derivadas de fuentes naturales para generar anticuerpos utilizando técnicas convencionales, bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, se administra la proteína (o “inmunógeno”) para sensibilizar a un mamífero tal como un mono, cabra, conejo o ratón. Los anticuerpos resultantes pueden recogerse como sueros policlonales, o pueden inmortalizarse células productoras de anticuerpos de animales sensibilizados (por ejemplo mediante fusión con una pareja de fusión de inmortalización para producir un hibridoma), células que entonces producen anticuerpos monoclonales.

a. *Anticuerpos policlonales*

La proteína de antígeno se utiliza o bien sola o bien conjugada con un vehículo convencional con el fin de aumentar su inmunogenicidad, y se genera un antisuero frente al conjugado péptido-vehículo en un animal, tal como se describió anteriormente. El acoplamiento de un péptido con una proteína vehículo e inmunizaciones pueden realizarse tal como se describe (Dymecki *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.*, 267: 4815). Se valora el suero frente a antígeno de proteína mediante ELISA o de manera alternativa mediante inmunotransferencia de puntos o manchas (Boersma y Van Leeuwen (1994) *J. Neurosci. Methods*, 51: 317). Se muestra que el suero reacciona considerablemente con los péptidos apropiados mediante ELISA, por ejemplo, siguiendo los procedimientos de Green *et al.* (1982) *Cell*, 28: 477.

b. *Anticuerpos monoclonales*

Se conocen bien técnicas para preparar anticuerpos monoclonales, y pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando cualquier antígeno candidato, preferentemente unido a un vehículo, tal como se describe por Arnheiter *et al.* (1981) *Nature*, 294, 278. Los anticuerpos monoclonales se obtienen normalmente a partir de cultivos tisulares de hibridoma o a partir de fluido ascítico obtenido de animales en los que se ha introducido el tejido de hibridoma. No obstante, puede describirse que los anticuerpos monoclonales son “generados frente a” o “inducidos por” una proteína.

Tras generarse, se somete a prueba la función y la especificidad de los anticuerpos monoclonales mediante cualquiera de un número de medios. También pueden utilizarse procedimientos similares para someter a prueba anticuerpos recombinantes producidos mediante presentación en fago u otras tecnologías de selección *in vitro*. Asimismo pueden examinarse hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (o sueros policlonales) para determinar la unión de anticuerpos al inmunógeno. Las pruebas inmunológicas particularmente preferidas incluyen inmunoensayos unidos a enzimas (ELISA), inmunotransferencia e inmunoprecipitación (véase Voller, (1978) *Diagnostic Horizons*, 2: 1, Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, MD; Voller *et al.* (1978) *J. Clin. Pathol.*, 31: 507; patente US reexpedida número 31.006; patente UK 2.019.408; Butler (1981) *Methods Enzymol.*, 73: 482; Maggio, E. (ed.), (1980) *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL) o radioinmunoensayos (RIA) (Weintraub, B., *Principles of radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, págs. 1-5, 46-49 y 68-78), todo para detectar la unión del anticuerpo al inmunógeno frente al que se ha generado. Resultará evidente para un experto en la materia que o bien la molécula de anticuerpo o bien el inmunógeno debe marcarse para facilitar tal detección. Resultarán bien conocidas para los expertos en la materia técnicas para marcar moléculas de anticuerpo (véase Harlour y Lane (1989) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 1-726).

De manera alternativa, pueden utilizarse otras técnicas para detectar la unión al inmunógeno, confirmando de ese modo la integridad del anticuerpo que ha de servir o bien como antígeno genérico o bien como antígeno diana según la invención. Éstos incluyen procedimientos cromatográficos tales como SDS PAGE, isoelectroenfoque, inmunotransferencia tipo Western, HPLC y electroforesis capilar.

Los “anticuerpos” se definen en la presente memoria como construcciones que utilizan la región de unión (variable) de tales anticuerpos, y otras modificaciones de anticuerpos. Por tanto, un anticuerpo útil en la invención puede comprender anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, agregados de anticuerpos polifuncionales, o en general cualquier sustancia que comprende uno o más sitios de unión específica de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser fragmentos tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab')<sub>2</sub> o cualquier derivado de los mismos, tales como fragmentos Fv de cadena sencilla. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser no recombinantes, recombinantes o humanizados. El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgM, etc. Además pueden utilizarse agregados, polímeros, derivados y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado.

*Regulación de la unión de ligando a un FASTbody según la invención*

Durante los experimentos descritos anteriormente, se descubrió que la presencia de uno o más ácidos grasos unidos al FASTbody de la presente invención regula la unión específica de armazones individuales a su ligando. De manera específica se ha encontrado que la presencia de uno o más ácidos grasos seleccionados de entre el grupo constituido por los ácidos grasos mostrados a continuación en la tabla 2, en el espacio de unión de ácido graso de un FASTbody según la invención regula la unión específica del ligando al armazón.

## ES 2 315 896 T3

Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión “ácido graso” incluye dentro de su alcance derivados de ácido graso, homólogos, análogos y/o fragmentos de los mismos, siempre que tales derivados, homólogos, análogos y/o fragmentos de los mismos presenten la actividad requerida de unión a FASTbody y la correspondiente modulación de la unión específica del ligando a un FASTbody tal como se describe en la presente memoria.

TABLA 2

*Ácidos grasos comunes*

Nombres químicos y descripciones de algunos ácidos grasos comunes				
Átomos comunes	Número de carbonos	Dobles enlaces	Nombre científico	Fuentes
Ácido butírico	4	0	ácido butanoico	grasa butírica
Ácido caproico	6	0	ácido hexanoico	grasa butírica
Ácido caprílico	8	0	ácido octanoico	aceite de coco
Ácido cáprico	10	0	ácido decanoico	aceite de coco
Ácido láurico	12	0	ácido dodecanoico	aceite de coco
Ácido mirístico	14	0	ácido tetradecanoico	aceite de semilla de palma
Ácido palmítico	16	0	ácido hexadecanoico	aceite de palma
Ácido palmitoleico	16	1	ácido 9-hexadecenoico	grasas animales
Ácido esteárico	18	0	ácido octadecanoico	grasas animales
Ácido oleico	18	1	ácido 9-octadecenoico	aceite de oliva
Ácido linoleico	18	2	ácido 9,12-octadecadienoico	aceite de maíz
Ácido alfa-linoleico (ALA)	18	3	ácido 9,12,15-octadecatrienoico	aceite de semilla de lino (linaza)
Ácido gamma-linoleico (GLA)	18	3	ácido 6,9,12-octadecatrienoico	aceite de borraja
Ácido araquídico	20	0	ácido eicosanoico	aceite de cacahuete, aceite de pescado
Ácido gadoleico	20	1	ácido 9-eicosenoico	aceite de pescado
Ácido araquidónico (AA)	20	4	ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	grasas de hígado
EPA	20	5	ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	aceite de pescado
Ácido behénico	22	0	ácido docosanoico	aceite de colza
Ácido erúcico	22	1	ácido 13-docosenoico	aceite de colza
DHA	22	6	ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	aceite de pescado
Ácido lignocérico	24	0	ácido tetracosanoico	pequeñas cantidades en la mayoría de las grasas

De manera ventajosa, el ligando es RAS. De manera más ventajosa, el ligando es RAS y el ácido graso es uno o más de los enumerados. De manera más ventajosa, el ligando es RAS y el ácido graso es ácido oleico.

Por tanto, según la presente invención, se contemplan FASTbodies en los que la afinidad de unión a ligando puede regularse mediante la unión del FASTbody al ligando en presencia de uno o más ácidos descritos en la presente memoria. Además puede realizarse la medición de la unión a ligando del FASTbody extrapolando el cambio en la disociación de ácido graso con respecto a la afinidad de unión del FASTbody a ligando.





## ES 2 315 896 T3

### *Recuperación de la biblioteca de FASTbody de 9 aminoácidos aleatorizada*

Con el fin de presentar las estructuras de FASTbody sobre la superficie de bacteriófago filamentosos se recuperó el fagémido utilizando un fago auxiliar según procedimientos convencionales.

- 5 1. Se añadieron 500  $\mu$ l de reserva de la biblioteca de FASTbody de 9 aminoácidos a 200 ml de 2xTY que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 1%.
- 10 2. Cultivar con agitación a 37°C hasta que la DO 600 sea de 0,5.
3. Añadir  $1 \times 10^{12}$  de fago auxiliar KM13 (Kristensen P. 1998)
4. Incubar sin agitación a 37°C durante 45 min. y con agitación a 37°C durante 45 min.
- 15 5. Centrifugar a 3.000 g durante 10 min. Resuspender en 500 ml de 2xTY que contiene ampicilina 100  $\mu$ g/ml, kanamicina 50  $\mu$ g/ml.
6. Incubar con agitación a 30°C durante la noche.
- 20 7. Centrifugar el cultivo durante la noche a 3.300 g durante 30 min.
8. Añadir 125 ml de PEG/NaCl (Polietilenglicol 6000 al 20%, NaCl 2,5 M) a 500 ml sobrenadante. Mezclar bien y dejar durante 1 h sobre hielo.
- 25 9. Centrifugar a 3.300 g durante 30 min. Separar vertiendo PEG/NaCl. Volver a centrifugar brevemente y aspirar cualquier resto restante de PEG/NaCl.
10. Resuspender el sedimento en 40 ml de PBS y centrifugar a 11.600 g durante 10 min. en una microcentrífuga para eliminar cualquier residuo bacteriano restante.
- 30 11. Añadir 8 ml de PEG/NaCl, mezclar y dejar sobre hielo durante 1 hora.
12. Centrifugar a 3.300 g durante 30 min. Separar vertiendo PEG/NaCl. Volver a centrifugar brevemente y aspirar cualquier resto restante PEG/NaCl.
- 35 13. Resuspender el sedimento en 20 ml de PBS y centrifugar a 11.600 g durante 10 min. en una microcentrífuga para eliminar cualquier residuo bacteriano restante.
- 40 14. Añadir glicerol hasta una concentración final del 15% y almacenar a -80°C en pequeñas alícuotas hasta su utilización.
15. Para valorar la reserva de fago diluir 1  $\mu$ l de fago en 100  $\mu$ l de PBS, 1  $\mu$ l de éste en 100  $\mu$ l de PBS, etc. hasta que hay 6 diluciones en total. Añadir 900  $\mu$ l de TG1 a una DO 600 de 0,5 a cada tubo e incubar a 37°C en un baño de agua durante 30 min. Sembrar en placa cada dilución sobre una placa de TYE que contiene ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 1% y cultivar durante la noche a 37°C. La reserva de fago debe ser de  $10^{12}$ - $10^{13}$ /ml.

### Ejemplo 2

#### 50 *Selección de la biblioteca de FASTbody de 9 aminoácidos sobre proteínas modelo*

Para examinar el potencial para generar agentes de unión a partir de la biblioteca de FASTbody aleatorizada de 9 aminoácidos, se realizaron selecciones de prueba en la RAS humana recombinante comercialmente disponible de sigma (R9894). La selección seguía esencialmente procedimientos convencionales tal como se describió anteriormente:

- 55 1) Recubrir el tubo para inmunización durante la noche con 4 ml de  $\text{HCO}_3$  50 mM pH 9,6 que contiene 50  $\mu$ g de RAS.
- 2) Al día siguiente lavar el tubo 3 veces con PBS
- 60 3) Llenar el tubo hasta su capacidad máxima con MPBS al 2% (leche en polvo desnatada al 2% en PBS). Incubar a t.a. reposando en el banco durante 2 h para bloquear.
- 4) Lavar el tubo 3 veces con PBS.
- 65 5) Añadir de  $10^{12}$  a  $10^{13}$  de fago de la biblioteca de FASTbody de presentación en fago en 4 ml de MPBS al 2%. Incubar durante 60 min. a t.a. girando utilizando un soporte giratorio que gira en la vertical y entonces reposar durante 60 min. más a t.a. Desechar el sobrenadante.

## ES 2 315 896 T3

- 6) Lavar los tubos 10 veces con PBS que contiene Tween 20 al 0,1% y 10 veces con PBS.
- 7) Eliminar por agitación el PBS en exceso y eluir el fago añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de tripsina-PBS (50  $\mu\text{l}$  de disolución madre de tripsina 10 mg/ml añadida a 450  $\mu\text{l}$  de PBS) y girar durante 10 min. a t.a. utilizando un soporte giratorio que gira en la vertical.
- 8) Tomar 10 ml de TG1 a una DO 600 de 0,5 y añadir el fago eluido. Incubar durante 30 min. a 37°C sin agitación.
- 9) Preparar diluciones de 10 veces y cultivar en placa las mismas sobre placas de TYE que contienen ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 1%. Se recogen las bacterias restantes mediante centrifugación a 3.000 g durante 10 min., se disuelve el sedimento en 200-500  $\mu\text{l}$  de medio y se cultivan en placa sobre placas de TYE que contienen ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 1%.
- 10) Cultivar las placas a 37°C durante la noche.

### *ELISA de fago monoclonal para la unión a RAS*

Se realiza un ELISA con el fin de identificar colonias individuales que producen partículas de fago que expresan la estructura de FASTbody que reconocen RAS:

### *Recuperación*

1. Inocular colonias individuales a partir de las placas de la primera ronda de selección en 100  $\mu\text{l}$  de 2xTY que contiene ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 1% en placas de 96 pocillos. Cultivar con agitación (250 rpm) durante la noche a 37°C.
2. Utilizar un dispositivo de transferencia de 96 pocillos para transferir un pequeño inóculo desde esta placa hasta una segunda placa de 96 celdas-pocillos que contiene 200  $\mu\text{l}$  de 2xTY con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y glucosa al 1% por pocillo. Cultivar con agitación (250 rpm) a 37°C durante 2 h. (Preparar reservas de glicerol de placa de 96 pocillos original, añadiendo glicerol hasta una concentración final del 15%, y luego almacenar las placas a -80°C).
3. Tras 2 h de incubación añadir 25  $\mu\text{l}$  de 2xTY que contiene ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , glucosa al 1% y  $10^9$  de fago auxiliar KM13 (Kristensen P. 1998).
4. Agitar (250 rpm) a 37°C durante 1 h. Centrifugar a 1.800 g durante 10 min., luego eliminar por agitación el sobrenadante.
5. Resuspender el sedimento en 200  $\mu\text{l}$  de 2xTY que contiene ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y kanamicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cultivar con agitación (250 rpm) durante la noche a 30°C.
6. Centrifugar a 1.800 g durante 10 min. y utilizar 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en ELISA de fago.

### *ELISA*

7. Se recubre una placa NUNC maxisorp de 96 pocillos durante la noche con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{HCO}_3^-$  50 mM pH 9,6 que contiene 50 ng de RAS por pocillo. Además se recubren dos placas con antígenos no relevantes (ubiquitina y BSA) para comprobar la reactividad cruzada hacia el otro antígeno. También se deja una placa vacía controlando el fago que porta un armazón que se une al agente de bloqueo. Se tratan todas las placas de manera similar a la indicada a continuación.
8. Lavar los pocillos 3 veces con PBS.
9. Añadir 300  $\mu\text{l}$  por pocillo de MPBS al 2% (leche desnatada en polvo al 2% en PBS) para bloquear e incubar durante 2 h a temperatura ambiente.
10. Lavar los pocillos 3 veces con PBS. Añadir 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de fago de lo anterior y 50  $\mu\text{l}$  de MPBS al 4%.
11. Incubar durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Desechar la disolución de fago y lavar 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y 3 veces con PBS.
12. Añadir 1 en dilución de 5000 veces de HRP-anticuerpo-anti-M1311 en 100  $\mu\text{l}$  de MPBS al 2% por pocillo. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente.

## ES 2 315 896 T3

13. Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y 3 veces con PBS
14. Añadir 100  $\mu$ l de disolución de sustrato (4 comprimidos de OPD en 12 ml de H<sub>2</sub>O y 50 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%).
15. Detener la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M.
16. Leer la DO a 495 nm

### 10 *Resultados*

Tal como se describió anteriormente se sometieron a prueba 96 colonias para determinar la unión a RAS, ubiquitina, BSA y leche desnatada en polvo en PBS. Se aislaron varios clones positivos, a continuación se representa la unión 4 clones a los 4 antígenos. Los tres clones 2-4-F; 3-12-F; 3-11-E mostraron una unión específica a RAS (figura 8).

A medida que la producción de partículas de fago tenía lugar mediante el crecimiento en un extracto de levadura, se consideró una posibilidad de que los FASTbodies posiblemente podían unirse a un ácido graso al mismo tiempo que se unían a la RAS diana.

Puesto que BSA se une de manera natural a ácidos grasos, se realizó un experimento de ELISA en el que el leche desnatada en polvo utilizado en las etapas de bloqueo e incubación descritas en el procedimiento anterior se sustituyó por BSA al 2%. Si el FASTbody se une a ácidos grasos y esta unión es necesaria para la unión a la RAS diana, se esperaría una disminución en la unión a la RAS diana en presencia de BSA. La figura 9 muestra el resultado del ELISA, especialmente para los clones 2-4-F y 3-11-E, se observa una disminución en la unión específica a RAS, indicando por tanto que la unión a RAS se ve influida por la presencia de ácidos grasos en los FASTbodies.

### Ejemplo 3

Basándose en uno de los clones aislados para la unión a RAS (3-11-E del ejemplo 2, véase la figura 10 para información de secuencia) se construyó una nueva biblioteca mediante aleatorización a hebra  $\beta$  E y F de conexión en bucle.

Con el fin de permitir una fácil manipulación del bucle entre la hebra  $\beta$  E y F se introdujo un sitio de restricción único tras la secuencia de bucle. Junto con la presencia de un sitio de restricción PstI único delante de la secuencia de bucle, esto permite una fácil manipulación de la región de bucle.

Los dos cebadores  $\beta$ 5 $\beta$ 6SerS y FABP545AS se utilizaron en la amplificación. El cebador  $\beta$ 5 $\beta$ 6SerS incorpora un sitio XbaI tras la secuencia de bucle y al mismo tiempo porta el sitio de restricción PstI permitiendo la inserción en la estructura principal de FABP. El cebador FABP545AS está ubicado 142 nucleótidos corriente abajo del sitio NotI.

**$\beta$ 5 $\beta$ 6 SerS: 5'-**

**GTCAC**CTGCAGATGAC**CTAGAAAAGTCAAGAGCACCATAACC- 3'**

**FABP 545 AS: 5'-TTGTCGTCTTTCCAGACGTTAG-3'**

Se realizó la amplificación utilizando 25 pmol de cada cebador, dNTP 0,2 mM, 1x tampón de Pfu polimerasa (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM) y 2,5 unidades de Pfu ADN polimerasa. Como molde se utilizó ADN de fagémido del clon 3-11-E. Se realizó la reacción de amplificación utilizando el siguiente perfil de temperatura: 96°C 5 min.; 20 x (96°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 1 min.); 72°C 10 min. Se purificó el producto de PCR de 329 pares de bases y se digirió con las enzimas de restricción PstI y NotI utilizando condiciones convencionales y se ligó en el fagémido que codifica para el agente de unión 3-11-E.

Se generaron dos bibliotecas diferentes insertando 5 y 7 aminoácidos aleatorizados en la E  $\beta$  y F  $\beta$  de conexión en bucle.

Se realizaron dos reacciones de PCR utilizando condiciones convencionales tal como se resumió anteriormente en la figura 11.

La primera PCR primaria utilizó los cebadores FABP 61S y  $\beta$ 5 $\beta$ 6 AS, amplificando un fragmento que comenzaba alrededor del sitio HindIII en la secuencia de vector y que acababa delante del bucle entre la hebra  $\beta$  E y F.

La segunda PCR primaria utilizaba los cebadores FABP545AS y o bien b5b6S R5 o bien b5b6S R7 (introduciendo 5 y 7 residuos aleatorizados respectivamente), amplificando un fragmento que cubría el bucle que iba a aleatorizarse y que acababa en la secuencia de vector.

## ES 2 315 896 T3

### Cebadores utilizados:

5  $\beta$ 5 $\beta$ 6 AS: AGT GAC TTC GTC AAA TTC C

$\beta$ 5 $\beta$ 6 S 7R: GGA ATT TGA CGA AGT CAC TNN KNN KNN KNN KNN KNN  
KNN KAG GAA AGT CAA GAG CAC C

10  $\beta$ 5 $\beta$ 6 S 5R: GGA ATT TGA CGA AGT CAC TNN KNN KNN KNN KNN KAG  
GAA AGT CAA GAG CAC C

15 FABP 545 AS : 5'-TTGTCGTCTTTCCAGACGTTAG-3'

FABP 61 S : AAT GAA ATA CCT ATT GCC TAC GG

20 Se purificaron los productos de PCR utilizando el kit de preparación de PCR de Qiagen según las instrucciones. Se ensamblaron los fragmentos de PCR en una reacción de PCR secundaria utilizando los mismos cebadores externos tal como anteriormente (FABP 61S y FABP 545AS) en condiciones convencionales de PCR.

25 Se purificó en gel el producto de PCR y se digirió con las enzimas de restricción PstI y NotI (utilizando procedimientos convencionales tal como se resumió anteriormente). Tras el ligamiento en el vector que codifica para el 3-11-E FASTbody se digirió previamente con las mismas enzimas y se purificó.

### Ejemplo 4

30 La biblioteca de segunda generación basada en el agente de unión 3-11-E a RAS, en la que la región de bucle que conecta E  $\beta$  y F  $\beta$  se había sustituido o bien con 5 o bien 7 aminoácidos aleatorizados, se seleccionó para la unión a RAS tal como se describió en el ejemplo 2.

35 Tras la selección se sometieron a prueba 96 colonias para determinar la unión a RAS utilizando un procedimiento similar al descrito anteriormente en el ejemplo 2.

Para 5 de los FASTbodies que proporcionaban una señal más fuerte en comparación con el FASTbody original 3-11-E, se examinó adicionalmente la influencia de añadir ácidos grasos durante las etapas de unión y de lavado.

- 40 1. Se recubre una placa NUNC maxisorp de 96 pocillos durante la noche añadiendo 100  $\mu$ l de leche desnatada en polvo al 2% en PBS en la primera fila. En la segunda fila 100  $\mu$ l de HCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6 que contiene 50 ng de RAS por pocillo. En la tercera fila 100  $\mu$ l de leche desnatada en polvo al 2% y oleato 100  $\mu$ M. En la cuarta fila 100  $\mu$ l de HCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6 que contiene 50 ng de RAS por pocillo y oleato 100  $\mu$ M. La quinta fila 100  $\mu$ l de leche desnatada en polvo al 2% y oleato 100 mM. Y finalmente en la sexta fila 100  $\mu$ l de HCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6 que contiene 50 ng de RAS por pocillo y oleato 100  $\mu$ M.
- 45 2. Lavar los pocillos 3 veces con PBS. El PBS utilizado para lavar las filas 5 y 6 además contenía oleato 100  $\mu$ M.
- 50 3. Añadir 300  $\mu$ l por pocillo de MPBS al 2% (leche desnatada en polvo al 2% en PBS) para bloquear e incubar durante 2 h a temperatura ambiente. La disolución de bloqueo utilizada para la serie 5 y 6 contenía oleato 100  $\mu$ M.
- 55 4. Lavar los pocillos 3 veces con PBS de nuevo lavar la fila 5 y 6 con PBS que contiene oleato 100  $\mu$ M. Añadir 50  $\mu$ l de sobrenadante de fago de lo anterior y 50  $\mu$ l de MPBS al 4%, añadir oleato hasta 100  $\mu$ M en la fila 5 y 6.
- 60 5. Incubar durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Desechar la disolución de fago y lavar 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y 3 veces con PBS. De nuevo los tampones utilizados para la fila 5 y 6 contenían oleato 100  $\mu$ M.
- 65 6. Añadir dilución de 1 en 5000 de HRP-anticuerpo-anti-M1311 en 100  $\mu$ l de MPBS al 2% por pocillo. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente, incubar la fila 5 y 6 en presencia de oleato 100  $\mu$ M.
7. Lavar 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,1% y 3 veces con PBS con oleato 100  $\mu$ M añadido a las disoluciones de lavado para la fila 5 y 6.

## ES 2 315 896 T3

8. Añadir 100  $\mu$ l de disolución de sustrato (4 comprimidos OPD en 12 ml de H<sub>2</sub>O y 50 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%).

9. Detener la reacción añadiendo 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M.

5 10. Leer la DO a 495 nm

Los resultados del ELISA se muestran en la figura 12 e indican claramente que la aleatorización del bucle que conecta la hebra b E y F da como resultado en FASTbodies con una capacidad de unión aumentada a RAS utilizada en la selección. Para algunos de los agentes de unión existe una clara influencia sobre la adición de oleato en el experimento de ELISA, estableciendo por tanto que la unión de FASTbodies al ligando está modulada por la presencia de ácidos grasos libres en el experimento.

Se analizaron adicionalmente todos los clones mediante secuenciación de ADN utilizando procedimiento convencional. Las secuencias de bucle de los FASTbodies aislados se muestran en la figura 13. Todas las secuencias son diferentes y pueden obtenerse agentes de unión a partir de la biblioteca aleatorizada de 5 aminoácidos y la biblioteca aleatorizada de 7 aminoácidos.

### Ejemplo 5

20 Para permitir pruebas de las propiedades de unión de los agentes de unión aislados, se clonaron los agentes de unión en el vector de expresión pET-11d.

El vector de expresión pET-11d se había modificado previamente para contener un sitio NotI seguido por etiqueta myc y una etiqueta his, permitiendo por tanto que se clonara el agente de unión como un fragmento de NcoI/NotI (figura 13).

Los FASTbodies pueden subclonarse en el vector pET-11d modificado digiriendo el vector pHEN2 que porta el FASTbody con las enzimas de restricción NcoI y NotI. El fragmento de ADN es el purificado en gel y ligado en el vector pET-11d modificado digerido previamente con las mismas enzimas. El ligamiento sigue protocolos convencionales. El ligamiento es el transformado en cepas de *E. Coli* con una T7 ADN polimerasa bajo el control de un promotor de lacZ, tal como ER2566 (novagen).

### Expresión de FABP-agentes de unión

35 Se tomaron clones de placas TYE, se cultivaron durante la noche a 37°C en 2xTY complementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 1%, antes de la dilución 1:100 en 2xTY con ampicilina 100  $\mu$ g/ml y glucosa al 0,1% y se incubaron durante cuatro horas a 37°C con agitación (la DO600 debe ser de aproximadamente 0,7-0,9). Se indujeron los cultivos mediante la adición de IPTG 1 mM y se cultivaron durante la noche a temperatura ambiente. Se sedimentaron las células a 6000xg y se resuspendieron en Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0 antes de la lisis en prensa francesa (American Instruments Co., inc. Silver Spring, MD, EE.UU.). Se aclaró la suspensión posteriormente mediante centrifugación (26000xg) y se complementó el sobrenadante con imidazol 30 mM y NaCl 300 mM antes de someterse a cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). Se incubó Ni-NTA con el sobrenadante durante 2 horas a 4°C, y posteriormente se lavó un mínimo de 100 ml de tampón de lavado (Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM) seguido por 50 ml de tampón de lavado altamente salino (Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,0, NaCl 750 mM, imidazol 30 mM). Se eluyó la proteína con tampón de lavado complementado con imidazol hasta 300 mM. Se determinó la concentración de proteína Bradford y se analizó la pureza mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

### Ejemplo 6

50 Para establecer la actividad biológica de la expresión de un FASTbody que se une a RAS se introdujo de manera intracelular la unión a RAS (Appel K.F. *et al* 2004 y figura 15 y figura 16) digiriendo el vector pHEN2 que porta el FASTbody con la enzima de restricción NcoI según 3-11-E 89-8-E en el vector pEUKA7-kan mediante procedimientos convencionales tal como se describió anteriormente. Se trató el plásmido linealizado con T4 ADN polimerasa para crear un extremo romo según las instrucciones del fabricante. Después de esto se generó el fragmento de ADN que codificaba para el FASTbody escindiendo con la enzima de restricción NotI en una reacción convencional y se purificó en gel el fragmento de ADN antes del ligamiento en el vector pEUKA7-Kan.

### Transformación de *M. circinelloides*

60 Se realizaron la formación y transformación de protoplastos tal como se describió anteriormente (Appel K.F. *et al.* 2004) con las siguientes modificaciones. Se prepararon protoplastos mediante tratamiento enzimático de líneas germinales con una mezcla de 125  $\mu$ g de quitosanas-RD (US Biological, MA, US) y 5 U de quitinasa (de *Streptomyces griseus*, Sigma) en un volumen final de 2 ml. Se llevó a cabo la digestión de la pared celular durante 2-3 h a 28°C. Normalmente, se usaron 1-10  $\mu$ g de ADN por transformación. Se seleccionaron los transformantes en medio YNB. Las cepas de transformante de *Mucor* KFA143 en las que se sustituye el FASTbody por el gen de kanamicina sirvieron como control.

## ES 2 315 896 T3

Se cultivaron cepas de *Mucor* transformadas en condiciones aerobias o anaerobias respectivamente (figura 17). Cuando se cultivó *Mucor* en condiciones aerobias se observó un aumento marcado de ramificación, se ha obtenido un fenotipo que se asemeja a los otros fenotipos cuando se expresa *Mucor* en el que se ha mutado el gen de RAS. Cuando se cultivó en condiciones anaerobias se observó poco o nada de crecimiento, también en línea con estudios previos de otros. En conclusión, existe un efecto marcado sobre el fenotipo cuando se expresan FASTbodies que se unen a las proteínas RAS de manera intracelular en *Mucor*.

### Ejemplo 7

Se creó una biblioteca de fragmentos génicos sintéticos que codificaban las regiones del sitio PstI y para el sitio NotI del FASTbody mediante ensamblaje de oligonucleótidos tal como se describe a continuación. La biblioteca de fragmentos génicos sintéticos da como resultado la aleatorización de las regiones de bucle que conectan hebra  $\beta$  E-F, hebra  $\beta$  G-H, hebra  $\beta$  I-J (figura 18). La biblioteca de fragmentos génicos sintéticos se combinó entonces con la biblioteca descrita en el ejemplo 1, creando juntas una biblioteca de FASTbodies totalmente aleatorizada.

Se ensamblaron los 8 oligonucleótidos sintéticos Proampfor; ProRan1; Profor 1.2; ProRan 2; Profor 3.2; ProRan3; Profor 5 y Proampback realizando 10 reacciones de ensamblaje conteniendo cada una 10 pmol de cada oligonucleótido y dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1x tampón de Taq polimerasa (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM) y 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa. Se incubaron las reacciones de ensamblaje con el siguiente perfil de temperatura durante 5 ciclos (96°C 30 s; 50°C 30 s; 72°C 1 min.) seguido por incubación a 72°C durante 10 min. Con el fin de amplificar los fragmentos génicos ensamblados se añadieron 25 pmol de cada uno de los cebadores Proampfor y Proampback a cada reacción y se realizó la amplificación en 10 ciclos con el siguiente perfil (96°C 30 s; 55°C 30 s; 72°C 1 min.) y finalmente se extendió a 72°C durante 10 min.

Se purificaron en gel los fragmentos génicos resultantes utilizando el kit de purificación en gel de Qiagen y se digirieron con las enzimas de restricción PstI y NotI utilizando condiciones convencionales. Se purificó plásmido de la biblioteca de FASTbody preparada tal como se describió en el ejemplo 1 a partir de 200 ml de cultivo de TG-1 utilizando el kit de preparación Midi-plasmid de Qiagen según las instrucciones del fabricante y se digirió el plásmido utilizando PstI y NotI utilizando procedimientos convencionales. Se purificó en gel el vector pHEN2 que contenía parte del gen de FASTbody que portaba la secuencia de 9 aminoácidos aleatorizada y se llevó a cabo la optimización de reacciones de ligamiento utilizando T4 ADN ligasa en condiciones convencionales. Se sometió a electroporación la biblioteca de FASTbodies aleatorizada total ligada resultante en TG-1 y se recuperó la biblioteca esencialmente tal como se describe en el ejemplo 1 para la biblioteca de 9 aminoácidos, dando como resultado una biblioteca de FASTbody que contenía  $2 \times 10^7$  secuencias diferentes tal como se estimó a partir del número de clones obtenidos de la reacción de ligamiento.

#### Proampfor

ccttcatactgggcccaggaatttgacgaagtcactgcagatgg

#### ProRan 1

cttttctagagtctccmnmnmnmnmnmnmnaccatctgcagtgactt

#### Profor 1.2

gagactCtagaaaagtcaagagcaccataaccttagatgggggtgtcctggtacatgtacagaaatg

#### ProRan 2

Ggtggtcgactttccmnmnmnmnmnmnmngccatcccatttctgtacatgta

#### Profor 3.2

gaaagTcgaccaccataaagagaaaacgagaggatgataaactagtggtgc

#### ProRan 3

Tggaggtgaccccmnmnmnmnmnmnmntcctttcatgacggattccaccactagttta

#### profor 5

Gtcacctccacgagagtttatgagagagcagc

#### Proampback

Ccgtgatggtgatgatgatgtgcccgcgtgctctctc

## ES 2 315 896 T3

### Ejemplo 8

Se usó la biblioteca de FASTbody aleatorizada total descrita en el ejemplo 7 para seleccionar agentes de unión frente a RAS tal como se describió en el ejemplo 2 siendo la única modificación que se añadió oleato 0,1 mg/ml a todos los tampones.

Se obtuvieron  $2 \times 10^5$  colonias tras cuya selección se tomaron 96 y se realizó una recuperación monoclonal con el fin de realizar ELISA tal como se describió en el ejemplo 2 con la única modificación de que se añadió oleato 0,1 mg/ml a todos los tampones.

Tal como se muestran en la figura 19 había por lo menos 13 clones positivos cuando se tomaba como positivo una puntuación por encima de 0,08 como medida mediante absorbancia a 490 nm.

Describiéndose haciendo referencia a las formas de realización preferidas específicas, debe apreciarse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse de manera indebida a dichas formas de realización específicas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Almacén proteico de unión a ácidos grasos, denominado FASTbody, que puede unirse específicamente a uno o más ligandos, derivándose dicho almacén de una proteína de unión a ácidos grasos intracelular eucariota y comprendiendo dicho almacén un polipéptido de cadena sencilla con las propiedades estructurales siguientes:

(a) el almacén contiene 10 hebras  $\beta$ , denominadas ABCDEFGHI y J, conectadas mediante regiones de bucle que determinan la especificidad de unión a ligando, en el que las hebras  $\beta$  forman juntas una estructura de almeja  $\beta$ ; y en el que

(b) las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -A y  $\beta$ -B;  $\beta$ -C y  $\beta$ -D;  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J se ubican en el mismo sitio de la estructura de almeja  $\beta$ ; en el que el almacén de unión a ácidos grasos no contiene ninguna cisteína que forme puentes disulfuro; en el que el almacén no comprende un motivo de hélice-bucle-hélice.

2. Almacén de unión a ácidos grasos según la reivindicación 1, que está constituido por un polipéptido de cadena sencilla con las propiedades estructurales siguientes:

(a) el almacén contiene 10 hebras  $\beta$ , denominadas ABCDEFGHI y J, conectadas mediante regiones de bucle que determinan la especificidad de unión a ligando, en el que las hebras  $\beta$  forman juntas una estructura de almeja  $\beta$ ; y en el que

(b) las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -A y  $\beta$ -B;  $\beta$ -C y  $\beta$ -D;  $\beta$ -E y  $\beta$ -F;  $\beta$ -G y  $\beta$ -H;  $\beta$ -I y  $\beta$ -J se ubican en el mismo sitio de la estructura de almeja  $\beta$ ; en el que el almacén de unión a ácidos grasos no contiene ninguna cisteína que forme puentes disulfuro; en el que el almacén no comprende un motivo de hélice-bucle-hélice.

3. Procedimiento para generar un almacén proteico de unión a ácidos grasos tal como se definió en la reivindicación 1, denominado FASTbody, que se deriva de una proteína intracelular eucariota y comprendiendo dicho procedimiento:

(a) proporcionar una proteína de unión a ácidos grasos de cadena polipeptídica sencilla, o el ácido nucleico que la codifica; y

(b) aleatorizar el motivo de hélice-bucle-hélice, o el ácido nucleico que lo codifica.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende una etapa adicional (c), en el que se aleatorizan una o más regiones de bucle que conectan hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y/o J, o el ácido nucleico que las codifica.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se aleatoriza la región de bucle que conecta las hebras  $\beta$  B y E.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se aleatorizan las regiones de bucle que conectan  $\beta$ -E y  $\beta$ -F,  $\beta$ -G y  $\beta$ -H y  $\beta$ -I y  $\beta$ -J.

7. Almacén proteico de unión a ácidos grasos, denominado FASTbody, que se deriva de una proteína intracelular eucariota que puede obtenerse según el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

8. Constructo de ácido nucleico que codifica para un almacén proteico de unión a ácidos grasos, denominado FASTbody, según la reivindicación 1 ó 2.

9. Vector que comprende un constructo de ácido nucleico según la reivindicación 8.

10. Célula huésped que comprende un vector según la reivindicación 9.

11. Procedimiento para cambiar la especificidad de unión a ligando de un almacén de unión a ácidos grasos, denominado FASTbody, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

(a) proporcionar un almacén de unión a ácidos grasos según la reivindicación 1 ó 2, y

(b) aleatorizar uno o más bucles que conectan las hebras  $\beta$  denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I y J.

12. Biblioteca de almacenos proteicos de unión a ácidos grasos, denominados FASTbodies, según la reivindicación 1 ó 2.

## ES 2 315 896 T3

13. Procedimiento para seleccionar un armazón de unión a ácidos grasos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, armazón que puede unirse a un ligando definido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- 5 (a) proporcionar una biblioteca de proteína de unión a ácidos grasos, denominada FASTbody, según la reivindicación 12;
- (b) someter a prueba la capacidad de la biblioteca según la etapa (a) para unirse al ligando definido; y
- 10 (c) seleccionar los armazones de unión a ácidos grasos según la etapa (b) que pueden unirse al ligando definido.

14. Utilización de un ácido graso en la modulación de la unión de ligando específico a uno o más FASTbodies según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

15 15. Utilización de un ácido graso en la monitorización de la unión de ligandos específicos a uno o más FASTbodies según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

20 16. Procedimiento de identificación de un candidato a fármaco potencial que puede desplazar la unión de un FASTbody según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a la diana, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:

- (a) proporcionar una biblioteca de FASTbodies según la reivindicación 12,
- 25 (b) proporcionar una muestra de uno o más candidatos a fármaco; y
- (c) explorar la biblioteca para determinar la capacidad del uno o más candidatos a fármaco para desplazar la unión de uno o más FASTbodies dentro de la biblioteca según la etapa (a).

30

35

40

45

50

55

60

65

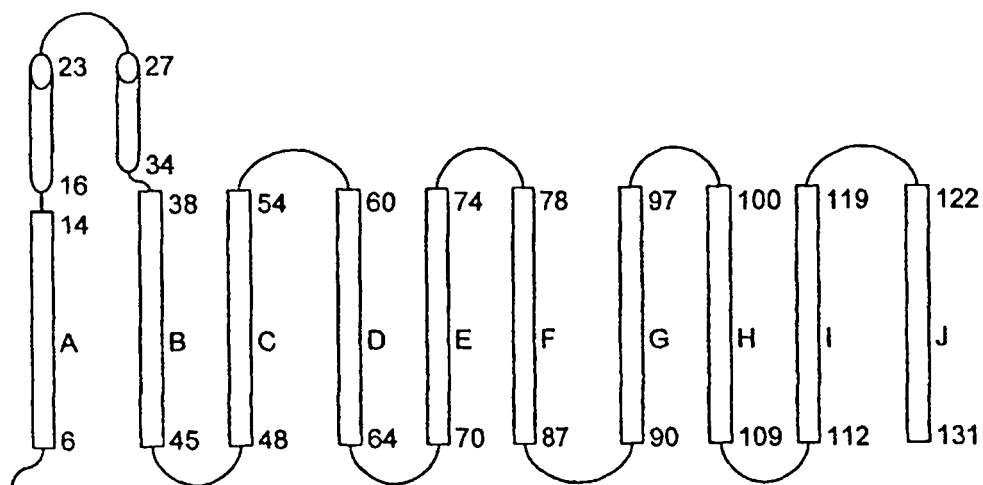


FIG. 1

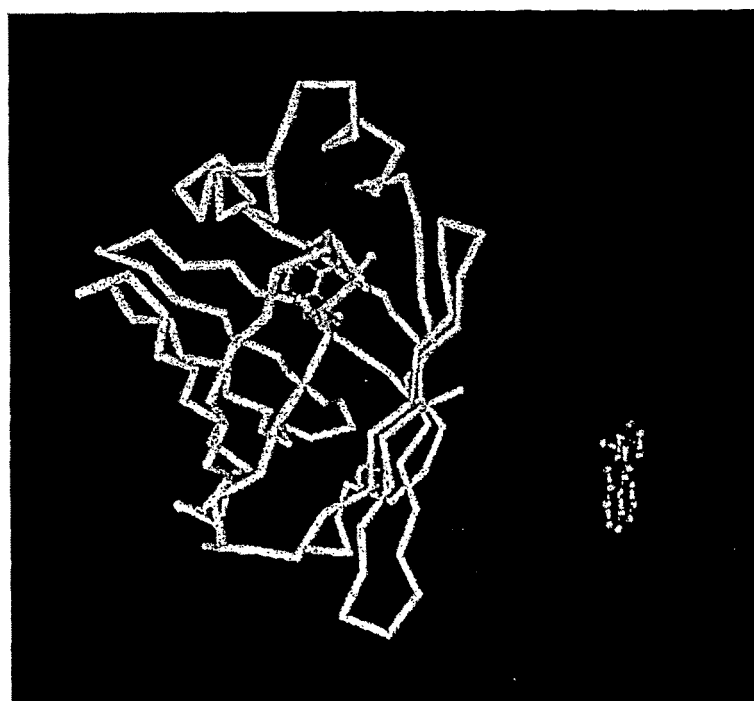
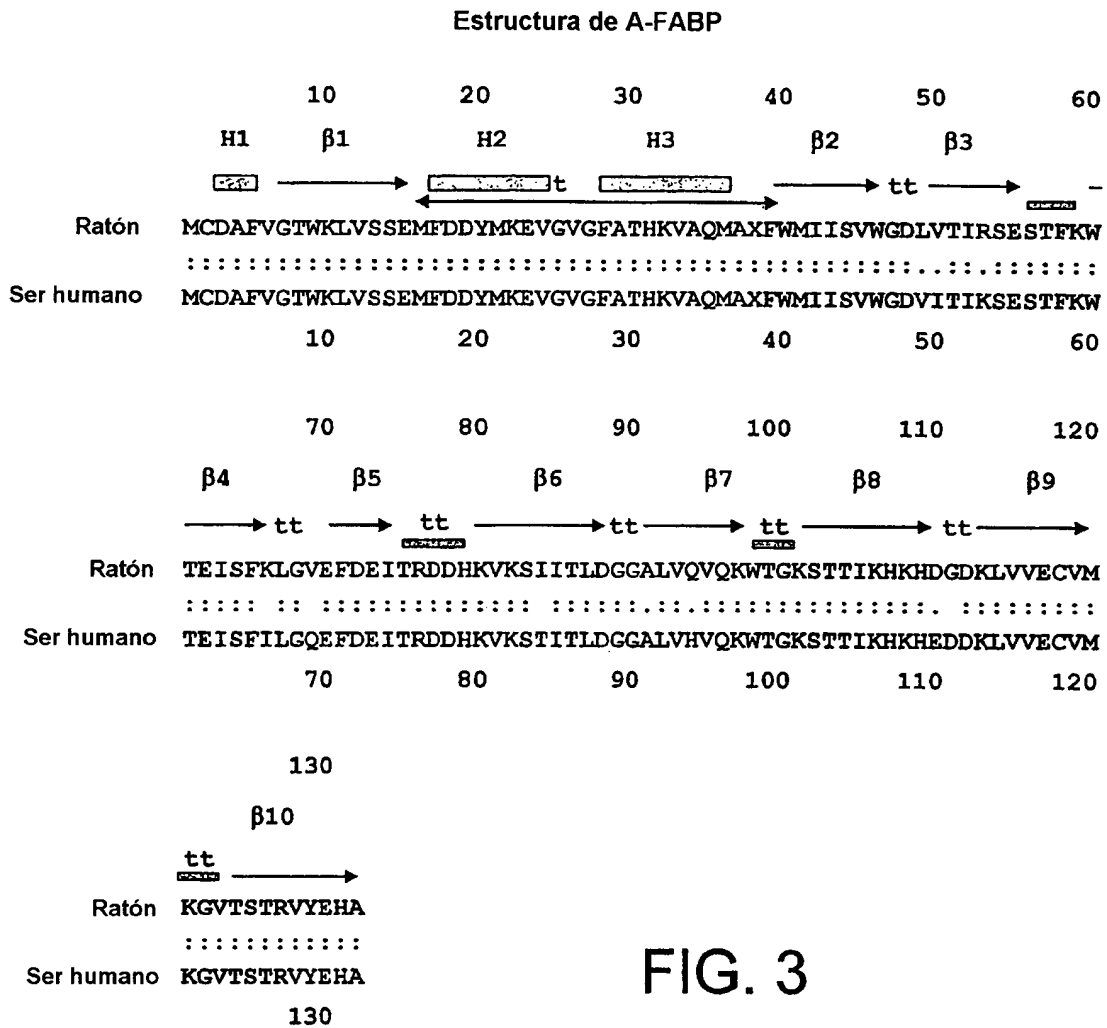


FIG. 2



**FIG. 3**

```

1  tgcagcttcc ttctcacctt gaagaataat cctagaaaac tcacaaaatg tgtgagcctt
61  ttgtaggtag ctggaaactt gtcctccagtg aaaacttga tgattatag aaagaagtatg
121  gagtgggctt tgccaccagg aaagtggctg gcatggccaa acctaacatg atcatcagtg
181  tgaatgggga tgtgataacc attaaatctg aaagtacct taaaaatact gagatttctt
241  tcataactggg ccaggaattt gacgaagtca ctgcagatga caggaaagtc aagagcacca
301  taaccttaga tgggggtgtc ctggtacatg tgcagaaatg gdatggaaa tcaaccacca
361  taaagagaaa acgagaggat gataaactgg tgggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt
421  ccacgagagt ttatgagaga gcataagcca agggacgttg acctggactg aagttcgcgt
481  tgaactctac aacattctgt gggatatatt gttcaaaaag atattgttgt tttccctgat
541  tttagcaagca agtaattttc tccaagctg attttattca atatggttac gttggttaa
601  taactttttt tagatttag
    
```

**FIG. 4**

aminoácido wt wt-FABP pHEN2 de a-FABP	<p>1 m c d a f v g t w k l v s s atg.tgtgatgctt ttgtaggtac ctggaaactt gtctccagtg</p> <p>15 e n aaaactttga tgattatatac aaagaagtag gagtgggctt</p> <p>29 n m i i s tgcaccagg aaagtggctg gcattggcaa acctaacatg atcatcagtg</p> <p>45 v n g d v i t i k s e s t f k n t tgaatggga tgtgatcacc attaaatctg aaagtacctt taaaaatact</p> <p>62 e i s f i l g g e f d e v t a d d gagatttctt cctactggg ccaggaattt gacgaagtca ctgcagatga</p> <p>79 r k v k s t i t l d g g v l v h caggaaagtc aagagcacca taaccttaga tgggggtgct ctggtacatg</p> <p>95 v q k w d g k s t t i k r k r e d tgcagaatg ggatggaaa tcaaccacca taaagaqaaa acgagaggat</p> <p>112 d k l v v e c v m k g v t s t r v gataaactgg tgggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt ccacgagagt</p> <p>129 y e r a ttatgagaga gcataa</p>
---	---

FIG. 5

ES 2 315 896 T3

pHEN2 de a-FABP  
FABP sin hélice

```
atg gccgatgctt ttgtaggtac ctggaaactt gtctccagtg
atg gccgatgctt ttgtaggtac ctggaaactt gtctcgagtg
                TGGAAACTT GTCTCGAGTG
                KpnI      XhoI
```

```
aaaactttga tgattatatg aaagaagtag gagtgggctt
aa
```

```
tgccaccagg aaagtggctg gcatggccaa acctaacatg atcatcagtg
                gctg gcatgtccgg acctaacatg atcatcagtg
                AGGTCCGG ACCTAACATG AT
                BspEI
```

```
tgaatgggga tgtgatcacc attaaatctg aaagtacctt taaaaaact
tgaatgggga tgtgatcacc attaaatctg aaagtacctt taaaaaact
```

```
gagatttcct tcatactggg ccaggaattt gacgaagtca ctgcagatga
gagatttcct tcatactggg ccaggaattt gacgaagtca ctgcagatga
```

```
caggaaagtc aagagcacca taaccttaga tgggggtgtc ctggtacatg
caggaaagtc aagagcacca taaccttaga tgggggtgtc ctggtacatg
```

```
tgcagaaatg ggatggaaaa tcaaccacca taaagagaaa acgagaggat
tgcagaaatg ggatggaaaa tcaaccacca taaagagaaa acgagaggat
```

```
gataaactgg tggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt ccacgagagt
gataaactgg tggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt ccacgagagt
```

```
ttatgagaga gcagcggccgc
ttatgagaga gcagcggccgc
```

FIG. 6

ES 2 315 896 T3

PHEN2 de a-FABP  
 biblio. de FASTbody  
 de 9 AA

```

atg gccgatgctt ttgtaggtac ctggaaactt gtctccagtg
atg gccgatgctt ttgtaggtac cTGGAAACTT GTCTCGAGTG
                                     KpnI           XhoI

aaaactttga tgattatag aaagaagtag gagtgggctt
AAAACNNKNN KNNKNNKNNK NNNKNNKNNKN NK

tgccaccagg aaagtggctg gcatggccaa acctaacatg atcatcagtg
gctg gcAGGTCCGG ACCTAACATG ATcatcagtg
                                     BspEI

tgaatgggga tgtgatcacc attaaatctg aaagtacctt taaaaatact
tgaatgggga tgtgatcacc attaaatctg aaagtacctt taaaaatact

gagatttcct tcatactggg ccaggaatth gacgaagtca ctgcagatga
gagatttcct tcatactggg ccaggaatth gacgaagtca ctgcagatga

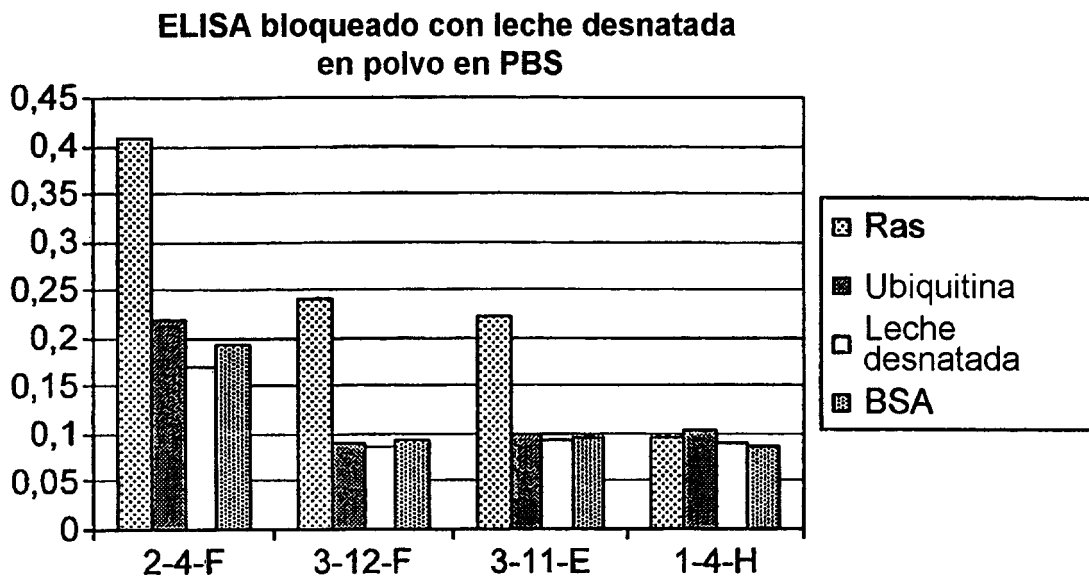
caggaaagtc aagagcacca taaccttaga tgggggtgtc ctggtacatg
caggaaagtc aagagcacca taaccttaga tgggggtgtc ctggtacatg

tgcagaaatg ggatggaaaa tcaaccacca taaagagaaa acgagaggat
tgcagaaatg ggatggaaaa tcaaccacca taaagagaaa acgagaggat

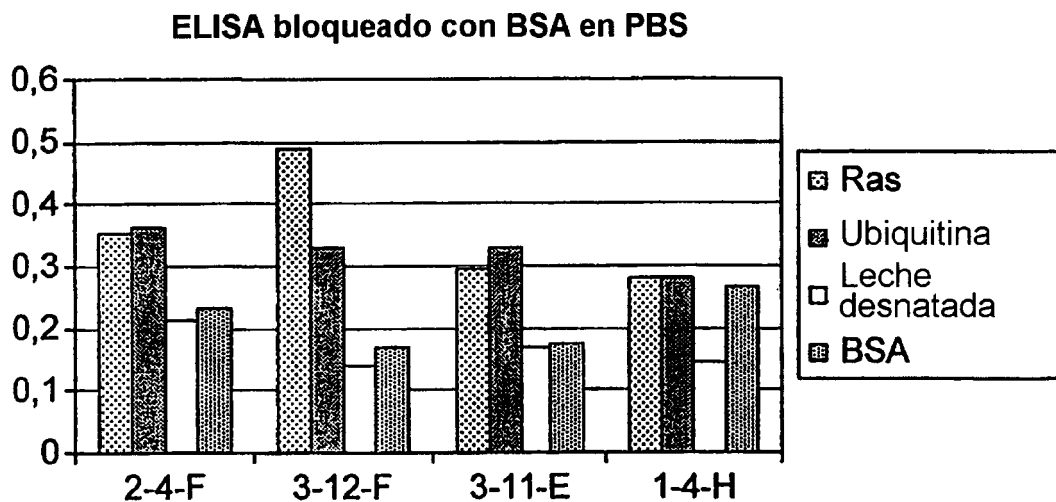
gataaactgg tgggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt ccacgagagt
gataaactgg tgggtggaatg cgtcatgaaa ggcgtcactt ccacgagagt

ttatgagaga gcagcggccgc
ttatgagaga gcagcggccgc
  
```

FIG. 7



**FIG. 8**



**FIG. 9**

3-11-E de RAS

NcoI XhoI  
 M A D A F V G T W K L V S S E N G F \*  
 CCGGCCATGGCCGATGCTTTTGTAGGTACCTGGAAACTTGTCTCGAGTGAAAACGGCTTTTAG  
 R R L R A S R S G P N M I I S V N  
 CGGCGTCTGCGGGCGAGTAGGTCCGGACCTAACATGATCATCAGTGTGAATGG

BspEI

FIG. 10

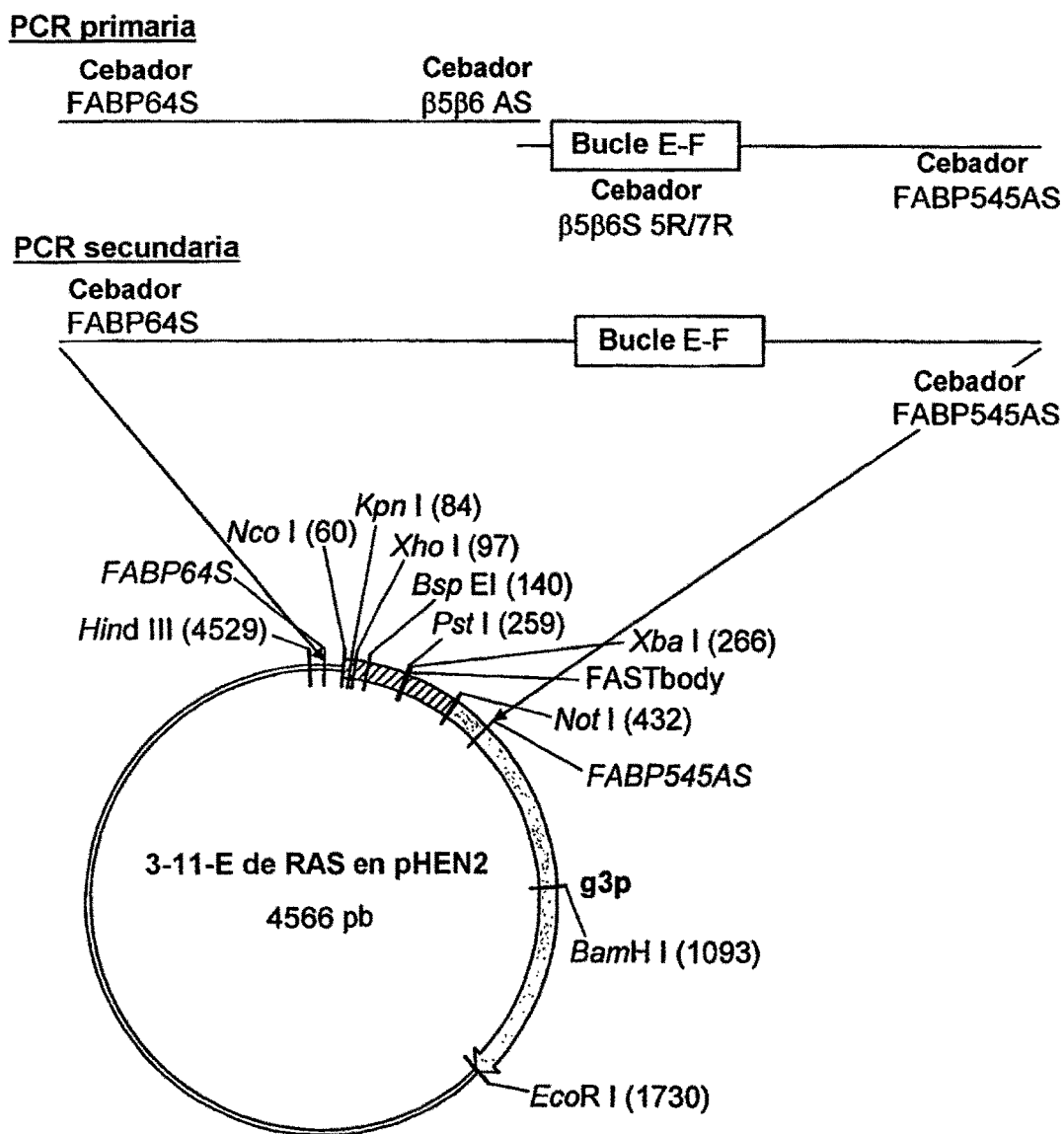
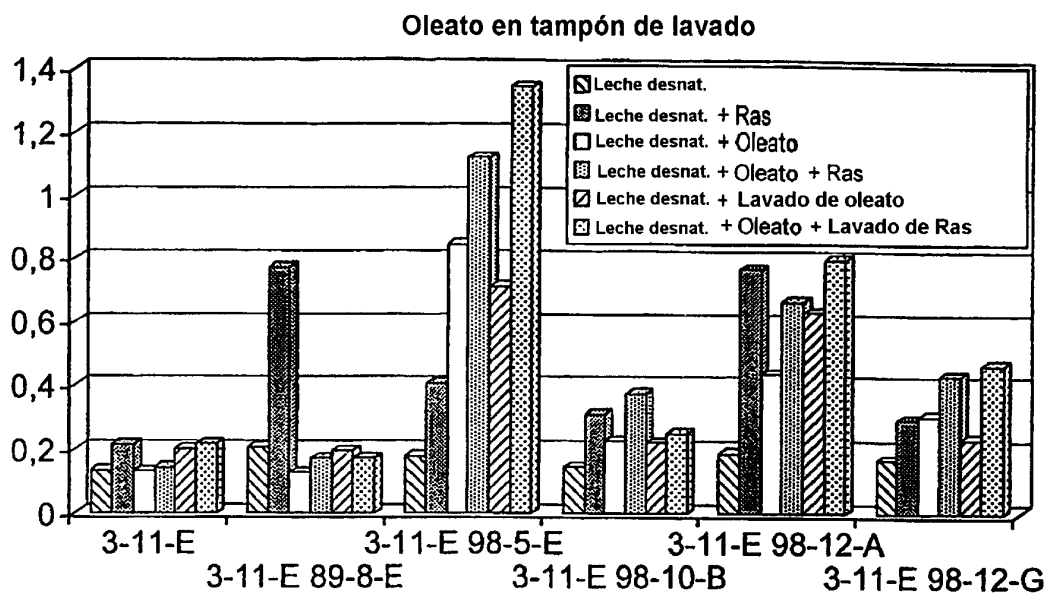


FIG. 11



**FIG. 12**

**3-11-E 89-8-E de RAS:**

GTC ACT CTG CAG TCT AAT CTT TCC CCT AGG AAA  
 V T L Q C N L S P R K

**3-11-E 98-5-E de RAS:**

GTC ACT CTT AGT GGT TTG TGT AGG AAA  
 V T L S R L C R K

**3-11-E 98-10-B de RAS:**

GTC ACT CTG GGT ACG TTG CAG AGG AAA  
 V T L G T L E R K

**3-11-E 98-12-A de RAS:**

GTC ACT ATT CCG GCT CGT TGT AGG AAA  
 V T I P A R C R K

**3-11-E 98-12-G de RAS:**

GTC ACT TCG GCG TGT CTT TTG AGG AAA  
 V T S A C L L R K

**FIG. 13**

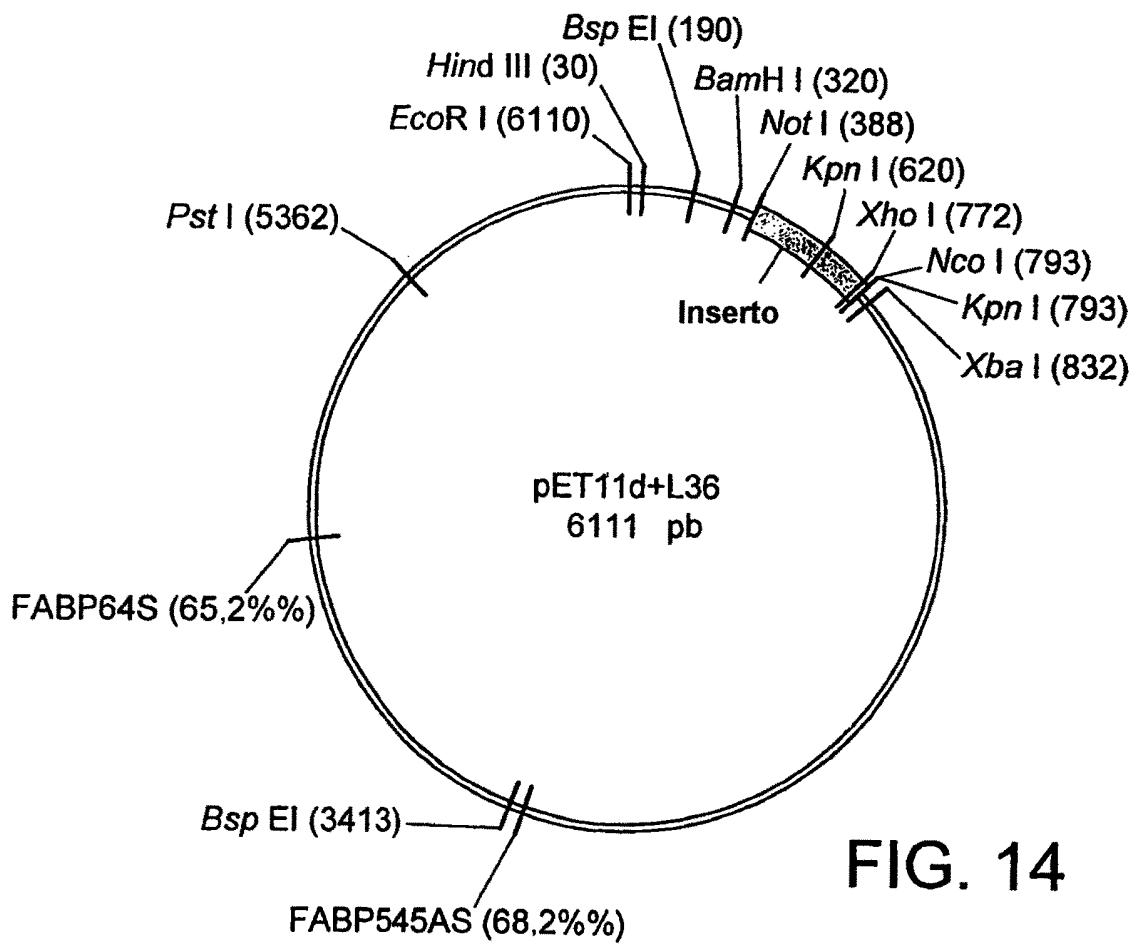
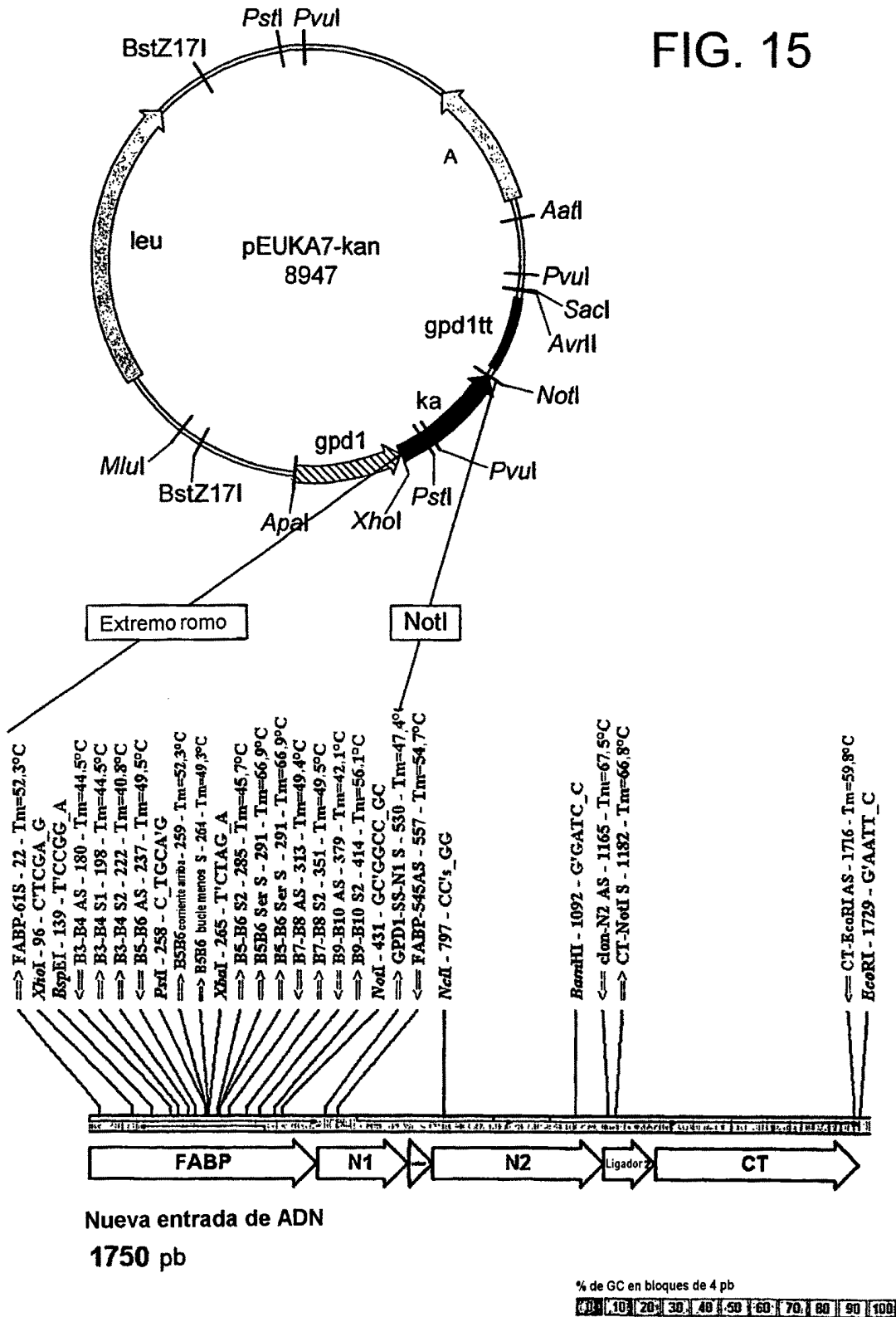


FIG. 14

FIG. 15



```

1 ATGGCCGATG CTTTTGTAGG TACCTGGAAA CTTGTCTCGA GTGAAAACGG
51 CATGGGGTGG CGGCCTAAGT GGGTGTCTTC CGGACCTAAC ATGATCATCA
101 GTGTGAATGG GGATGTGATC ACCATTAAAT CTGAAAGTAC CTTTAAAAAT
151 ACTGAGATTT CCTTCATACT GGGCCAGGAA TTTGACGAAG TCACTGCAGA
201 TGACAGGAAA GTC AAGAGCA CCATAACCCTT AGATGGGGGT GTCCCTGGTAC
251 ATGTGCAGAA ATGGGATGGA AAATCAACCA CCATAAAGAG AAAACGAGAG
301 GATGATAAAC TGGTGGTGGG ATGCGTCATG AAAGGCGTCA CTTCCACGAG
351 AGTTTATGAG AGAGCAGCGG CCGCTAATAC GTAAATCATT TCTAGTCATT
401 GCATTTTATA CACACATCTG TTACATAAAAT AAAC TTCATG TAAAAAGTCC
451 CTCATAAGAT CGTTTTTTGT TAATTAGCTT ATATTAATTT CTGTCCAAC
501 CCTCTGATAT GTAAAATGTT GACGAATGTC AAGTATTTTG ACAGGCAGAA
551 TGACAGCATA TATTTGAXGC CTGTGVACAA TCTGTGTTAC ATAAGATTCC
601 TGGTAAAGGA TGGATGATAT TATATTTTAC AGTTATAAGA GCCGGTATTG
651 GCACACGAAG GAAGCCTTGC AGCGAGAAGG ACGACGCTCT TTTTATAGG
701 CTCATCACTC AATGAGAGTT GCAGGAAGCA CTATTTTGTA AATGCCTGAA
751 ATACAGAGAC CCTCTGGACT ATTATTCTCA AGAAGCACTT TAACAAGAAA
801 AATATAGTTC TTTTGCTAAT TTC AAGACCT TAATCATATA TXXCGCTTC
851 ATTTTTATTT CATGGTTTCA TTCAATTTAT AGATGTATTA CTACACTACT
901 GATTGCTGTT ACTGTTACTA TCGCCCTGGC CATGTTGTTT GTTGTGTCG
951 CTGCCATCGC ATCGCCGTTA TTGTCATCGC CTAGGAATTG GCGGAGCTCG
1001 AATTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT
1051 TACCCAACTT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA
1101 ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG
1151 AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT CTCCTTACGC ATCTGTGCGG
1201 TATTTACACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC TCTGATGCCG
1251 CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA
1301 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC
1351 CGGGAGCTGC ATGTGTCAGA GGTFTTCACC GTCATCACCG AAACGCGCGA
1401 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA
1451 ATAATGGTTT CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTGGGGGAA ATGTGCGCGG
1501 AACCCCTATT TGTTTATTTT TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA
1551 TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT AATATTGAAA AAGGAAGAGT
1601 ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT TTGCGGCATT
1651 TTGCCCTCCT GTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAG GTAAAAGATG
1701 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC
1751 AGCGGTAAGA TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT
1801 GAGCACTTTT AAAGTTCTGC TATGTGGCGC GGTATATATCC CGTATTGACC
1851 CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC ACTATTCTCA GAATGACTTG
1901 GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG GCATGACAGT
1951 AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
2001 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG
2051 CACAACATGG GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT
2101 GAATGAAGCC ATACCAAACG ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA

```

FIG. 16

2151 TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAAC TG CCGAACTACT TACTCTAGCT  
 2201 TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGCTATTG CCGGATAAAG TTGCAGGACC  
 2251 ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG  
 2301 GAGCCGGTGA CCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT  
 2351 GGTAAGCCCT CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC  
 2401 TATGGATGAA CGAAATAGAC AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA  
 2451 AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT CATATATACT TTAGATTGAT  
 2501 TTAAAACCTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA TCCTTTTTGA  
 2551 TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTC CACTGAGCGT  
 2601 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG  
 2651 CGCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT  
 2701 TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAC TGGCT  
 2751 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA  
 2801 GGCCACCCT TCAAGAATC TGTAGCACCG CCTACATACC TCGCTCTGCT  
 2851 AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGCTTTACC  
 2901 GTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA  
 2951 ACGGGGGGTT CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA  
 3001 ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCTATGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG  
 3051 GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG  
 3101 CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT ATAGTCCTGT  
 3151 CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG  
 3201 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCTT TTTACGGTTC  
 3251 CTGGCCTTTT GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC  
 3301 TGATCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG  
 3351 CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG  
 3401 AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA  
 3451 TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA  
 3501 CGCAATTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTG GGCACCCAG GCTTTACTACT  
 3551 TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT  
 3601 CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTTG GGCTGCAGTA  
 3651 GCTGTTGATG TTGTTGTTGT ATCGTCATTT GTCGAGTTGA CCAGAATCGT  
 3701 ACAAATGCA AGTGATTCCA AGGGCATCGC AGGTAGATGA GCGCCTTTTC  
 3751 CACATAACCA TCCGCGTATA ATATGAATAA TGGGAGAATG CTCAAGTATC  
 3801 CAGCAGTTAC GCTAGTATTA AATAGCGTCA TGTTTCAGGAA AGAGGTTTGA  
 3851 CCAAAGCTCA CAATAGAGAA ATTTGGTTTT TTTTTGGGT GTTTGTCTGT  
 3901 CACAGGACTA GTATACTTGA TGTTGGGATC AGGCACACAC ACAAAGAGC  
 3951 AAAAGAGATT AGTAGGAGAG GAGATGCAGT TTATTGAAAA GATGAATGTT  
 4001 TGTGGAATTA TGGATATGAA TAGATCAAAG TATGAAGAAC GAAAATAGTA  
 4051 TTACAGTCAA AGAAAAATGCT TTTTATTACA TAAATTTACC AATCGAGCTT  
 4101 GGTCTTCTTC TTTTCAACCT CCACCGTTGA TAGAGATTTT AGTAGCCTTT  
 4151 CCCTTATAAC CCTTCCGTT TAACCAAGGC CTAGTTTCAG TACGCTTCAC  
 4201 CTCGAAATCA GCAATCTTGT CAGCCTTTTG CATGGTCAAC CCAATGTCAT  
 4251 CGAAGCCATT GACGAGACAG TGCTTGCGGA AAGCTTCTAC CTCAAAGGGC

FIG. 16 CONTINUACIÓN

4301 ACTTCATGAC CAGCAAAACG AACCACCTTGG TTGATCAAGT CCACTTCCAC  
 4351 TTCAGAGCCC TTCTTGGCCT CGGCAGCAAT GGCCTCTAAT TGATCTTGAG  
 4401 GAAGGACAAT GGGGAGCATA CCGTTCCTTGA AGCAGTTGTT GTAAAAGATA  
 4451 TCAGCAAAAC TGGGTGCAAG GATACAACGA ATACCAAAT CGTTAAAGGC  
 4501 CCAAGGAGCA TGTTACAGAG AACTACCACA GCCAAAGTTA GGACCTGTGC  
 4551 AGACCAAGGT ACGTCCCTTGA CGGTAAGGCT CTTAGGTTGA GGACAAAGTC  
 4601 AGGGTTCCTCG GCACCAGTAG CAGGGTCGAA ACGAAGAGCA TAGAAAAGAG  
 4651 CACTACCGAG ACCAGTACGC TTGATGGTCT TGAGGAATTG CTTGGGAATA  
 4701 ATCATATCAG TATCGACATT GGAGATATCA AGAGGAGCAG CATAACCTT  
 4751 GAGAGTAGTA AACTTGGGCA TACCAGCAGA GTCCCTGTG CTAGGAGGTG  
 4801 TAGCGACAGG GGCAGAATCA ACAGAGCTGG AATCAACATC GTCTTCCTCA  
 4851 GACTCGAATT CAGCAACCAC TTCTTGACGA GGGCTTTGCT TGGGAGTGCC  
 4901 AGGGATCTCA GAGACTTCCA TGTTACGAAC ATCTGTGAGA CAGCCCTTGA  
 4951 TGCCAGCAGC AGCAGCCATA GCAGGACTGA CAAGATGAGT ACGACCACCA  
 5001 GCACCTTGAC GACCCTCGAA ATTACGGTTG GATGTAGATG CACAACGCTC  
 5051 TCCAGGCTTC AATTGATCAG GGTTCCATACC GAGACACATG GAACAACCAG  
 5101 CCTCTCTCCA ATCGAAACCA GCGTCAGTAA AGATCTTGTC CAAACCTTCA  
 5151 CGCTCAGCTT GACGCTTGAC TAAACCAGAG CCAGGCACCA CCATGGCATC  
 5201 CACCCACTCA GCAGCACGCT TACCCTTTAC CACAGCAGCA GCAGCACGGA  
 5251 GATCCTCAAT ACGAGAGTTT GTACAACTAC CAATGAATAC CTTATCCACC  
 5301 TTGACGCCTT CCATAGGGGT GTTGGGAGCA ATACCAATGT AGTCGAGAGC  
 5351 ACGTTGGACA GCAGAGCGAC GAATGGGATC CTCATCTTG GCAGGATCAG  
 5401 GAGTGGAGCC AGTGATGGGG ACTACATCTT GAGGGCTGGT ACCCCAGGTA  
 5451 AGAGTAGGAG CAATATCAGC AGCGTTGATT TCGACGTTGA TATCGTATTT  
 5501 GGCATCGGCA TCAGAGCTGA GAGACTTCCA GTATTTGACA GCACGATCCC  
 5551 AATCAGCGCC CTTGGGAGCG AGAGGTTTAT CACGAAGGTA TTCAAAGGTC  
 5601 ACCTCATCAG GAGCCACCAT ACCAGCACGA GCACCAGCTT CAATGGACAT  
 5651 GTTACAGATG GACATTCTTG ACTCCATGGA GAGAGCAGCA ATGGTATCAC  
 5701 CACAGAACTC AATAACACAA CCAGTACCAC CAGCAGTACC AATGACACCA  
 5751 ATGATGTGAA GGACGATATC CTTGGATGTG ACGCCAGGGA GAGCCTTACC  
 5801 TTGAACGCGA ATACGCATGT TCTTTGACTT CTTTGTAAAG AGGGTTTGAG  
 5851 TAGCAAGTAC ATGTTCTACT TCGGATGTAC CAATACCAA AGCGAGAGCA  
 5901 CCAAAGGCAC CGTGTGTGGA TGTGTGTGAA TCGCCGCACA CAACAGTGGT  
 5951 TGCGGGGAGA GTGAAACCTT GCTCAGGGCC AATAACATGC ACAATACCTT  
 6001 GGCGGCTATC CTCCATGCCG AAATAAGTAA GACCAAAGGC TTCAATGTTT  
 6051 TGCTCAAGCG TCTCACATTG AGTTCTTGAA TCAGCTTCCT TGATAAAAGT  
 6101 GGTGATATTT TTGAAAATCT TTCTTGTTGT AGTAGGAATG TTGTGATCGA  
 6151 CAGTAGCGAG TGTACAATCA GGGCGACGTA CTGGACGATT GCGTACGA  
 6201 AGACCTTCGA AAGCTTGAGG ACTAGTAACT TCATGCACGA GATGTCTGTC  
 6251 GATATAGATC AAACAAGTAC CATCTTCTTG TTGATCAATG ACATGATCAT  
 6301 CCCAGACTTT ATCATAGAGA GTCGAGACAT TTTGTATATA GGGGATTGTT  
 6351 TTTTGAAAGA GAATGTAAGA ACAAGTTAAA GAAACAAGAA AATTCTCTCG

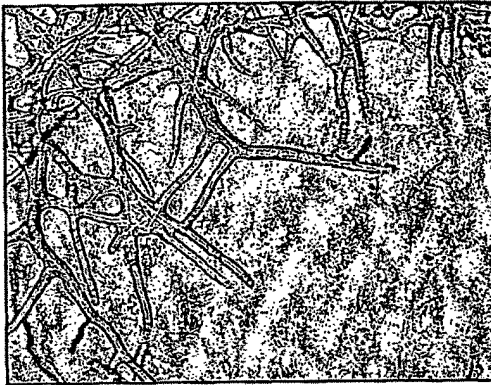
## FIG. 16 CONTINUACIÓN

6401 CTCGTCTACT AGCAGGTTGT TATAAAGTAA ATATTTGCAT TTATCCTGAC  
6451 TCAATGAGAT TGATGAAATC ATTGGTCAAT CTTACCGAGT TGGCACAGGT  
6501 TGTATCATGA GTCAGGCGTC TTGATTGCCT GTCAATTTAC ACATCCGACC  
6551 ACAAATGCT TGAAGTGAACA GTGACTCAAT GAGGCGTTGT TCTCTTATTG  
6601 GCCTAACTCT ACTTTCTTCC ATGTAACGTA AAGGCTGGGG ATTCTTTTTC  
6651 CCACTCCTTT CAAATCATAT CATTCAAAC AAATCTGCAA AAGACTAGTG  
6701 AGCGCCATGA AGATCATGAG CCTTTTCTA GATGGATTTT AATTGAGACT  
6751 TTGAGAGCAT ATGCAGCACC CCATGTGAGT ATATAACCACT TGATGGCACT  
6801 GTAATGCAGT ATTCATTAC AGATGTTCCG AAAAGAAATA TGCATTGATC  
6851 ATTTTCCATC ATGGAAAAC TTATACATAC ATGCACTTTT TGGATCTGTG  
6901 AGCATTTTGT CTAGACAAGA CACTAATTAT TACTACCGGT CATTTGATTT  
6951 TCTGCTGAAT AGAGTTGGTA GGGAGCACCG ATGATGTAGA AAAGGTGTCT  
7001 CACTAGATTT GTTAATTTTA AGAATTGATC CTCGGATGTG CCCTGAAAAC  
7051 AAAAGTATAA TCCATGTGGT GCAACAACCTC AACATTTGGT CCCCTTTACA  
7101 GGTAGAAAAT AACACACTGA CCATAGCATG TATAACCAT ACACACTCTA  
7151 CTATCGCCCT TGATGTCGTA AAATGACGTT GAGGAAGGCC TCATTGATTA  
7201 GAACGGCGAT TTGAAGCAA TGCCTCTTTC CCGAGTTTGA TCAAAGTTTA  
7251 TGTGACAGAT GCGCTAGATG AATAGTGCAA ACCTACAAAC CAGACTTTTA  
7301 ATAAGTTTGG CTGTGCTCAT CGCACTTGAG TTGCATAATA GAAGCTCGGG  
7351 TATCTTGT TTGGTGAAAC ACCGGGTTTT TAGCGATTAG ATTTAATGAT  
7401 TTACCCCTGA AATTTGTTGC CATGGATACC AAAATGCAGA TCATCTACTT  
7451 TCGGATCCCG CCATTTATGT TGCTCGGTTT ATAGCAGCAT TTAGAGATGC  
7501 GTCAGAGACC TTTCCGTATG CGTAAGGCAA AGCCATGTAG AGGCACACCA  
7551 TATCAAACAA GCTGGCATCA AAAGTGAAAT TTGAAGAGGA TCGATTGAGA  
7601 TTTGGGTGGT ATAATTTTCA CAGATGACAG ATGTTATATA CTACCTAGTA  
7651 GATTACCAAT CTTCAATATT TGACAATGAC AATAGACGCA TTTAAGTCTA  
7701 GCTCCAAGCA TTTGATGTAG TTAGAGTATT TCGCAATTCT TAATCGACTC  
7751 TAGAGGATCC CCAATTCGGC TTGGGCCCAA GCTTTCAAAT GTGTTGGATG  
7801 AACCAATTCAT CCCTATAATC TCTAATGAAA TCCCGAAGAT CTACACAGCA  
7851 TCACATTGGA TAGATGGGGC TGCTGTTTAT GTGATTAAAA CCTCACTGAT  
7901 ATTATCTGTT TCATGTAAAA AAAAATCTG TTGTGGTACA AACATTAGTG  
7951 TGAACCACGC GCAGCCATAC CACTAGTCAA AATAATGCTC TACTGCAAAA  
8001 AATGACGTTT GACGAATAAT GCAACGTA AAA GATGGTTTAG AAACCCTTGA  
8051 TATCCAGATT ACACGTGTAG CAGCCTTCGT GGGTATTTTT CATCACAAACA  
8101 CTACTAGGTA GCTCAGGGAT AGTTCAAACG GGCAATTTCC ATCCTCATCA  
8151 CACTTTATTC ACCAAGGAAA GAAGTGAAAT GGCATCTTCT SCGTTCAACA  
8201 TCTACAGGGA CATCTGTGAG ATACATCTGA TTGCTCGACA AGCGGACAAT  
8251 AGATGACACG TTATCAATGC TATCACTCTA AAATGTCATG TCTGACTGAG  
8301 TCCATTGCAA TCATCACTCC ATCCGACATC AGGTCACAAAT TTATGCTTCT  
8351 ATTTTCCAAT GGATCCGAAT CCGATTCAA CAAGATTAAT TCTCCCTCAA  
8401 AATACCCATG AAGTGTGAGA CATTGCGAAA TGTTATATAA ACCCAATGCA  
8451 TTTCTCGTCT TTCAGGGTTT TTTTCTTCTT CTTCACTATA TATCTCTATA  
8501 TATTTTATAA ATCTCGAC

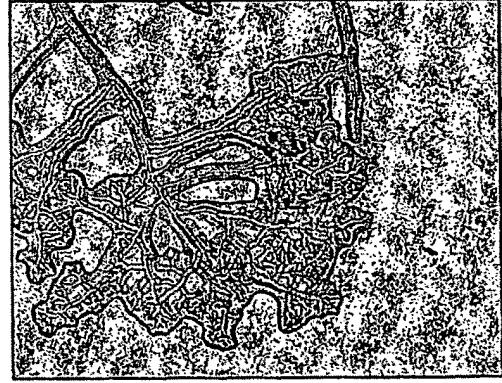
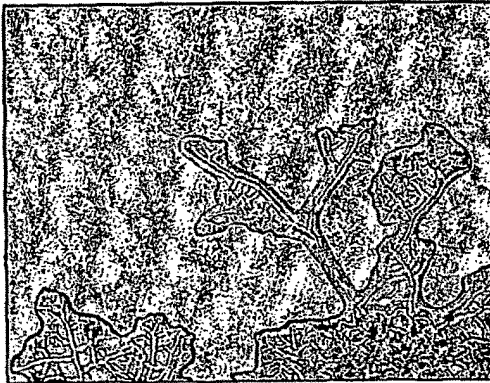
FIG. 16 CONTINUACIÓN

**Placas aerobias**

KFA143



XF1



XF3



**FIG. 17**

Placas anaerobias

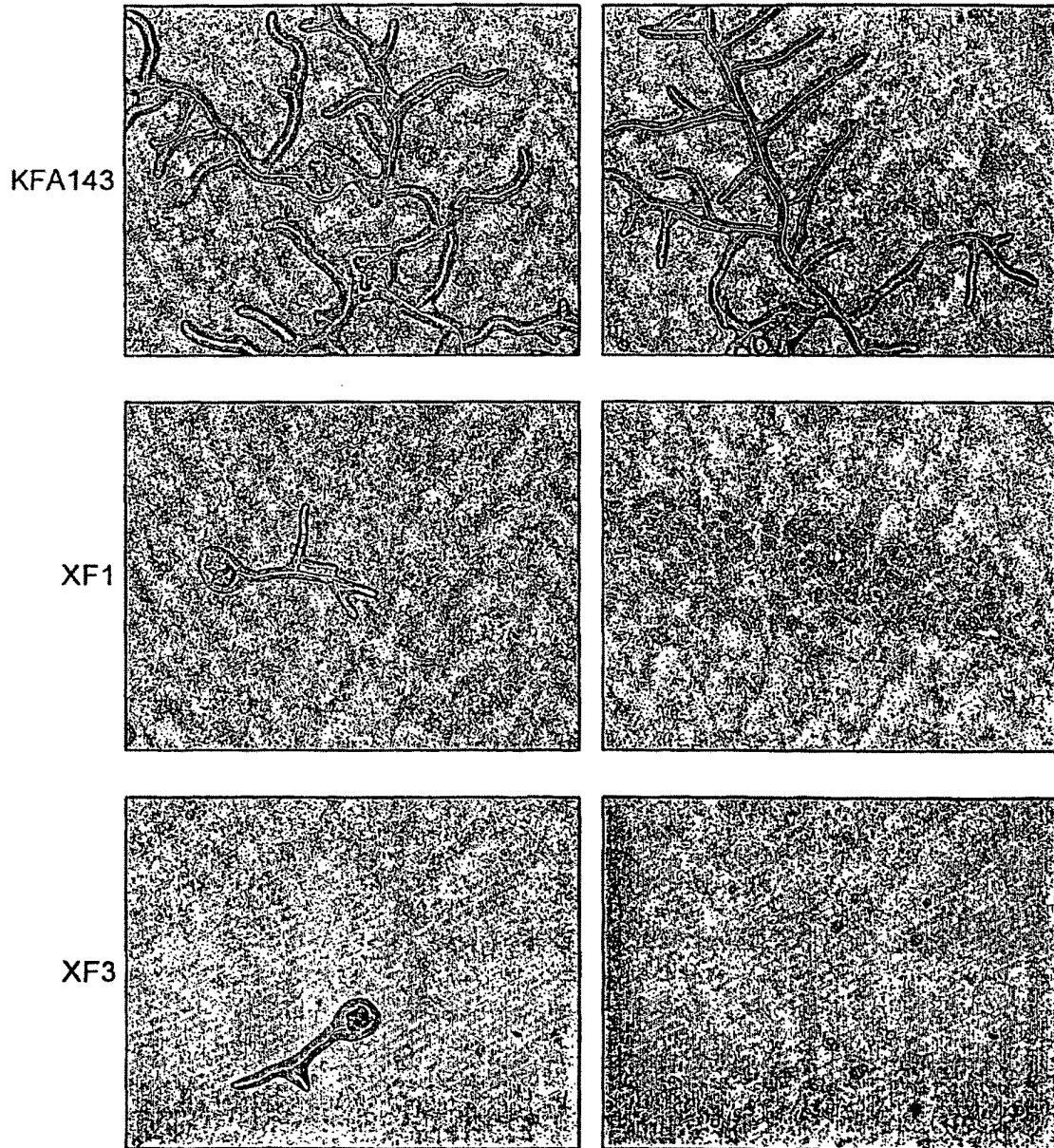


FIG. 17 CONTINUACIÓN



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,026	0,023	0,191	0,028	0,025	0,023	0,045	0,033	0,034	0,035	0,026	0,028
B	0,02	0,016	0,027	0,023	0,029	0,023	0,039	0,051	0,028	0,022	0,02	0,055
C	0,025	0,014	0,025	0,044	0,045	0,023	0,104	0,021	0,032	0,021	0,021	0,043
D	0,702	0,021	0,497	0,412	0,021	0,028	0,238	0,019	0,321	0,022	0,085	0,022
E	0,082	0,037	0,025	0,02	0,019	0,019	0,020	0,063	0,270	0,024	0,021	0,025
F	0,017	0,015	0,019	0,112	0,019	0,024	0,019	0,027	0,024	0,024	0,055	0,019
G	0,153	0,023	0,035	0,027	0,023	0,02	0,025	0,033	0,023	0,05	0,022	0,024
H	0,026	0,075	0,046	0,033	0,038	0,052	0,015	0,013	0,014	0,023	0,023	0,041

FIG. 19