



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 374**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06121439 .1**
96 Fecha de presentación : **05.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1752471**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Dominios de inmunoglobulina sintética con propiedades de enlace modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones de determinación de complementariedad.**

30 Prioridad: **05.01.2005 US 641144 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

73 Titular/es: **f-star Biotechnologische Forschungs-
und Entwicklungsges. mbH**
Gastgebasse 5-13
1230 Wien, AT

72 Inventor/es: **Rüker, Florian;**
Himmler, Gottfried y
Wozniak-Knopp, Gordana

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Dominios de inmunoglobulina sintética con propiedades de enlace modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones de determinación de complementariedad.

La presente invención se refiere a un método para el diseño y fabricación de una inmunoglobulina modificada.

El campo general es la ingeniería de proteínas con la finalidad de conferirles propiedades de enlace específicas. Más específicamente, las proteínas de diseño de relevancia aquí son inmunoglobulinas (anticuerpos), y aún más específicamente, dominios sencillos o pares o combinaciones de dominios sencillos de inmunoglobulinas. Las propiedades de enlace específicas de inmunoglobulinas son características importantes ya que controlan la interacción con moléculas tales como antígenos, y hacen útiles a las inmunoglobulinas para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La estructura de anticuerpos básica se explicará aquí utilizando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta.

Dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos ligeras idénticas (L) se combinan para formar la molécula de anticuerpo en forma de Y. Las cadenas pesadas tienen cada una cuatro dominios. Los dominios variables amino terminales (VH) están en las puntas de la Y. Estos son seguidos por tres dominios constantes: CH₁, CH₂ y CH₃ carboxi terminal, en la base del tronco Y. Un tramo corto, el conmutador, conecta las regiones constantes y variables de la cadena pesada. La bisagra conecta CH₂ y CH₃ (el fragmento Fc) al resto de anticuerpo (los fragmentos Fab). Un Fc y dos fragmentos Fab idénticos se pueden producir por escisión proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacta. Las cadenas ligeras están construidas con dos dominios, el variable (VL) y el constante (CL), separados por un conmutador.

Los enlaces disulfuro en la región bisagra conectan dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas por enlaces disulfuro adicionales. Las porciones carbohidrato enlazadas por Asn se conectan en diferentes posiciones en dominios constantes dependiendo de la clase de inmunoglobulina. En IgG1, dos enlaces disulfuro en la región bisagra, entre los pares Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas a través de dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s en los dominios CH₁ y Cys214s en los dominios CL. Las porciones carbohidrato se conectan a la Asn306 de cada CH₂, generando un bulto pronunciado en el tronco de la Y.

Estas características tienen consecuencias funcionales profundas. Las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras (VH) y (VL) se encuentran en las "puntas" de la Y, donde se ubican para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lado en el que se ubica el extremo N de la secuencia de aminoácidos. El tronco de la Y se proyecta de forma que medie eficientemente en funciones efectoras tales como la activación del complemento y la interacción con receptores Fc o ADCC y ADCP. Sus dominios CH₂ y CH₃ se abultan para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El extremo C de la secuencia de aminoácidos se ubica en el lado opuesto de la punta, que puede denominarse "fondo" de la Y. La estructura de una IgG1 intacta se ilustra en la Figura 1a.

En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda (λ) y kappa (κ). Una inmunoglobulina dada, tiene cadenas κ o cadenas λ , nunca una de cada. No se ha encontrado diferencia funcional entre anticuerpos que tengan con cadenas ligeras κ o λ .

La organización estructural de los monómeros de la clase de inmunoglobulina humana principal se ilustra en la Figura 1b. Las clases difieren en la composición y la secuencia de sus cadenas pesadas respectivas. Tanto IgM como IgE carecen de una región bisagra pero cada una contiene un dominio de cadena pesada extra (CH₄). Los números y las ubicaciones de los enlaces disulfuro (líneas) que enlazan las cadenas difieren entre los isotipos. También difieren en la distribución de los grupos carbohidrato N-enlazados, mostrados simbólicamente como círculos.

Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos hojas beta empaquetadas apretadamente entre sí en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina pliegue de la inmunoglobulina. El pliegue de la inmunoglobulina de dominios constantes contiene una hoja de 3-hebras empaquetadas contra una hoja de 4-hebras. El pliegue se estabiliza por puentes de hidrógeno entre las hebras beta de cada hoja, por enlace hidrofóbico entre los residuos de hojas opuestas en el interior, y por un enlace disulfuro entre las hojas. La hoja de 3-hebras comprende las hebras C, F y G, la hoja de 4-hebras tiene las hebras A, B, E y D. Las letras A a G representan las posiciones secuenciales de las hebras beta sobre la secuencia de aminoácidos del pliegue de la inmunoglobulina.

El pliegue de los dominios variables tiene 9 hebras beta dispuestas en dos hojas de 4 y 5 hebras. La hoja de 5-hebras es estructuralmente homóloga a la hoja de 3-hebras de los dominios constantes, pero contiene las hebras extra C' y C''. El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F, G) tiene la misma topología y una estructura similar a sus complementarias en el dominio constante de los pliegues de la inmunoglobulina. Un enlace disulfuro une las hebras B y F en hojas opuestas, como en los dominios constantes. El pliegue de la inmunoglobulina se ilustra en la Figura 2 para un dominio constante y uno variable de una inmunoglobulina.

Los dominios variables tanto de las cadenas de inmunoglobulina ligeras como de las pesadas contienen tres bucles hipervariables, o regiones para la determinación de complementariedad (Es). Las tres CDRs de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDRs son bucles que conectan las hebras beta B-C, C'-

C'' y F-G del pliegue de la inmunoglobulina. Los residuos en las CDRs varían de una molécula de inmunoglobulina a otra, impartiendo especificidad de antígeno a cada anticuerpo.

Los dominios VL y VH en las puntas de las moléculas de anticuerpo están estrechamente empaquetados de tal manera que las 6 CDRs (3' en cada dominio) cooperan para construir una superficie (o cavidad) para el enlace específico de antígeno. Así, el sitio de enlace del antígeno natural de un anticuerpo se compone de los bucles que conectan las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena ligera y las hebras B-C, C'-C'' y F-G del dominio variable de la cadena pesada.

Utilizando la estructura 3D de una proteína como ayuda para diseño, los residuos aminoácido ubicados en la superficie de muchas proteínas se han distribuido aleatoriamente utilizando como patrón la estructura del núcleo de la proteína. Ejemplos de esta estrategia se describen o resumen en las siguientes referencias, incorporadas aquí por referencia: Nygren PA, Uhlen M., *Curr Opin Struct Biol.* (1997) 7:463-9; Binz HK, Amstutz P, Kohl A, Stumpp MT, Briand C, Forrer C, Grutter MG, Pluckthun A. *Nat Biotechnol.* (2004) 22:575-82; Vogt M, Skerra A. *Chembiochem.* (2004) 5:191-9; US 6,562,617.

El principio básico de esta técnica se base en la observación de que muchas proteínas tienen un núcleo estable, formado por configuraciones específicas de elementos de estructura secundaria, tales como hojas beta o hélices alfa, que se interconectan a través de estructuras tales como bucles, giros o vueltas o espirales al azar. Típicamente, estos tres elementos estructurales son poco cruciales para la estructura total de la proteína, y los residuos aminoácido en estos elementos estructurales pueden intercambiarse a menudo sin destruir el pliegue general de la proteína. Un ejemplo de origen natural para este principio de diseño son las CDRs de los anticuerpos. Ejemplos artificiales incluyen lipocalinas, anquirinas y otros patrones de proteínas.

Los bucles que no son bucles CDR en una inmunoglobulina nativa no tienen especificidad de unión a antígeno o a epítipo pero contribuyen al pliegue correcto de la molécula de inmunoglobulina y/o su efector u otras funciones y por lo tanto se denominan bucles estructurales para el propósito de esta invención.

En la patente de los E.U.A. N° 6,294,654 se muestra que pueden elaborarse anticuerpos alterados donde un antígeno peptídico se puede incorporar en un bucle no-CDR de un anticuerpo (Ab) en la región CH₁ entre la región bisagra y la región variable, y el Ab resultante puede ser recuperado en una APC de tal manera que el antígeno peptídico se presente en la superficie de la APC en el contexto de MHC II, produciendo de este modo una respuesta inmune. Estos péptidos insertados son epítopos y la estructura total de la molécula portadora no es importante. Se demostró que un péptido ras puede situarse en un bucle (no-CDR) de una inmunoglobulina y ésta aún ser secretada. Hay un "control de calidad" severo en las células que evita que la inmunoglobulina sea secretada a menos que se pliegue adecuadamente, y alterar la secuencia de aminoácidos del bucle puede provocar que la proteína pliegue en una estructura que la célula detectará como incorrecta, y por lo tanto la degradará. De esta manera, además de los ejemplos mostrados, se considera difícil modificar adicionalmente los bucles estructurales sin cambiar la naturaleza de la inmunoglobulina.

La solicitud de patente de los E.U.A. N° 2004/0101905 describe el enlace de moléculas que comprenden un sitio de enlace diana y un péptido efector Fc. El péptido efector Fc es un péptido que interactúa con la molécula efectora. Se muestra la inserción de un péptido efector en un bucle no-DDR de un dominio CH₁ de un fragmento de inmunoglobulina.

Los péptidos efectores Fc son estructuras de origen natural en bucles no-CDR de anticuerpos y por lo tanto se espera que no perturben la estructura de la inmunoglobulina si se injertan en diferentes sitios equivalentes en una inmunoglobulina.

Sin embargo, todo péptido injertado en un bucle no-CDR de acuerdo con esta descripción tiene una alta probabilidad de ser inactivo por el diferente entorno estructural que se ha seleccionado.

Se establece en los dos documentos de la técnica anterior mencionados previamente que es difícil insertar péptidos en el bucle que debe retener su estructura y su función, siendo crítico no perturbar la estructura de pliegue de la inmunoglobulina ya que esto es importante para su funcionamiento y secreción.

Las solicitudes de patente de los E.U.A. N° 2004/0132101 y 2005/0244403 describen inmunoglobulinas mutantes con afinidad alterada de unión a un ligando efector, que son ligandos naturales para bucles estructurales de anticuerpos. En este documento se describe una variedad de mutaciones en diversas regiones a lo largo de toda la molécula de inmunoglobulina, que influyen la función efectora del anticuerpo completo.

El documento WO 01/83525 se refiere a proteínas que comprenden dominios Fc fundidos con péptidos biológicamente activos, en que dichos péptidos están fundidos a los dominios Fc en sus extremos N o C.

El documento US 2002/0106370 da a conocer polipéptidos quiméricos que comprenden una porción de enlace que muestra una afinidad específica de unión a la superficie de la célula eucariótica diana y una porción efectora.

El documento WO 02/32925 da a conocer proteínas capaces de una función anticuerpo similar. Para conseguirlo, también se introducen estructuras de bucle en dichas proteínas, que corresponden en estructura y posición a bucles CDR.

5 El documento WO 2006/036834 da a conocer moléculas y métodos en los que los péptidos biológicamente activos se incorporan en una región del bucle de un dominio Fc. El péptido biológicamente activo con la actividad biológica deseada se selecciona en primer lugar y después se introduce en los dominios Fc, bien enlazando en péptido con la proteína o por inserción del ácido nucleico respectivo en el ácido nucleico que codifica el dominio Fc.

10 Otros documentos de la técnica anterior muestran que el patrón tipo inmunoglobulina se ha empleado hasta ahora con el propósito de manipular el sitio de unión de antígeno existente, introduciendo de este modo nuevas propiedades de enlace. Sin embargo, hasta la fecha sólo las regiones CDR han sido sometidas a ingeniería para el enlace de antígeno, en otras palabras, en el caso del pliegue de la inmunoglobulina sólo se ha modificado el sitio de enlace del antígeno natural para cambiar su afinidad o especificidad de enlace. Existe una gran cantidad de bibliografía que describe diferentes formatos de estas inmunoglobulinas manipuladas, expresadas frecuentemente en forma de fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) o fragmentos Fab, ya sean presentados en la superficie de partículas fago o expresados en forma soluble en diversos sistemas de expresión procarióticos o eucarióticos. Entre los autores principales en este campo están Greg Winter, Andreas Plückthun y Hennie Hoogenboom.

20 Es objeto de la presente invención proporcionar inmunoglobulinas con nuevos sitios de enlace de antígeno introducidos y métodos para diseñar y fabricar dichas inmunoglobulinas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un dominio constante de inmunoglobulina o a parte de él, tal y como se define en las reivindicaciones 1 a 7 y a moléculas de ácido nucleico que codifican dicha inmunoglobulina, como se define en la reivindicación 7.

El método para diseñar una inmunoglobulina que comprende al menos una modificación en una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y para determinar el enlace de dicha inmunoglobulina con un epítipo de un antígeno, en el que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, comprende las etapas de:

- 30 - proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región del bucle estructural,
- modificar al menos un residuo nucleótido de al menos una de dichas regiones del bucle estructural,
- 35 - transferir el ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- expresar dicha inmunoglobulina modificada,
- 40 - poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con un epítipo, y
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo.

En particular, dicho método de diseño se refiere a la unión específica de una inmunoglobulina con un epítipo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales. través de la modificación en la región del bucle estructural, la inmunoglobulina puede ser diseñada para unirse al epítipo. En una modalidad preferida, la inmunoglobulina se une específicamente a al menos dos de dichos epítopos, que difieren entre sí, ya sean del mismo antígeno o de diferentes antígenos.

50 Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención se refiere al diseño de una unión específica de inmunoglobulina con al menos un primer epítipo y que comprende al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y la determinación del enlace específico de al menos dicha región del bucle hasta al menos un segundo epítipo, seleccionándose éste del grupo de antígenos mencionados anteriormente, donde la región no modificada del bucle estructural (región no-CDR) no se une específicamente al menos a dicho segundo epítipo, comprendiendo las etapas de:

- 60 - proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente con al menos un primer epítipo que comprende al menos una región del bucle estructural,
- modificar al menos un residuo nucleótido de al menos una de dichas regiones del bucle estructural,
- transferir el ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- 65 - expresar dicha inmunoglobulina modificada,
- poner en contacto la inmunoglobulina modificada con al menos dicho segundo epítipo, y

- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une al segundo epítipo.

El método se refiere preferiblemente a al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y a la determinación de al menos dicha región del bucle con al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumor, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos virales y antígenos protozoarios, donde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural no modificada no se une específicamente a al menos dicho antígeno.

El término “inmunoglobulinas” que se modifican de acuerdo con la presente invención (como se emplea aquí, los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables) pueden mostrar propiedades de unión mono- o multi-específicas o multivalentes, al menos dos, preferiblemente al menos tres sitios de unión específicos para epítopos de, por ejemplo, antígenos, moléculas/proteínas efectoras. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención también son fragmentos funcionales aceptados en la técnica, tales como Fc, Fab, scFv, dímeros de cadena sencilla de dominios CH/CL, Fv, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como Fd, V1, Vk, Vh) y la región constante de un anticuerpo intacto tal como CH1, CH2, CH3, CH4, C1 y Ck, así como mini-dominios consistentes en dos hebras beta de un dominio inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

Se entiende que el término “inmunoglobulina”, “inmunoglobulina modificada” “inmunoglobulina de acuerdo con la invención” incluye también un derivado de inmunoglobulinas. Un derivado es cualquier combinación de una o varias inmunoglobulinas de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o mini-dominio de la inmunoglobulina de la invención se puede fundir en cualquier posición de una o varias proteínas (tales como otras inmunoglobulinas, ligandos, proteínas patrón, toxinas enzimáticas y similares). Un derivado de la inmunoglobulina de la invención también se puede obtener mediante el enlace con otras sustancias mediante diversas técnicas químicas, tales como enlace covalente, interacción electrostática, enlaces disulfuro, etc.

Las tres sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas o cualquier combinación de ellas (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos, pero construida completa o parcialmente a partir de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

Las moléculas diseñadas de acuerdo con la presente invención serán útiles como proteínas autónomas, así como proteínas de fusión o derivados, más típicamente fusionadas de manera tal que sean parte de estructuras de anticuerpo mayores o moléculas de anticuerpo completas o partes de ellas, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Será posible utilizar las proteínas diseñadas para producir moléculas que son monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas e incluso pueden soportar más especificidades al mismo tiempo, y también será posible controlar y preseleccionar la valencia de enlace al mismo tiempo de acuerdo con los requerimientos del uso planeado de dichas moléculas.

De acuerdo con la presente invención, las regiones o sitios de unión a antígenos de todo tipo de alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, pueden introducirse en un bucle estructural de una estructura de anticuerpo dada.

El término “antígeno” de acuerdo con la presente invención representa moléculas o estructuras que se sabe que interactúan o son capaces de interactuar con la región del bucle CDR de las inmunoglobulinas. Las regiones del bucle estructural de la técnica anterior no interactúan con antígenos sino que más bien contribuyen a la estructura total y/o al enlace a moléculas efectoras.

El término “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales” de acuerdo con la presente invención debe incluir todos los alérgenos y antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo y fragmentos de dichas moléculas (en especial subestructuras a las que se refiere generalmente como “epítopos” (por ejemplo, epítopos de células B)), siempre que sean inmunológicamente relevantes, es decir, que también sean reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales.

El término “epítipo” de acuerdo con la presente invención representa una estructura molecular que puede constituir completamente un socio de unión específica o ser parte de un socio de unión específica al dominio de enlace o la inmunoglobulina de la presente invención.

Químicamente, un epítipo puede estar compuesto por un carbohidrato, un péptido, un ácido graso, una sustancia inorgánica o sus derivados y cualquier combinación de las mismas. Si el epítipo es un polipéptido, usualmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente 8 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 a 20 aminoácidos en el péptido. No hay límite superior crítico para la longitud del péptido, que puede comprender casi toda la longitud de la secuencia del polipéptido. Los epítopos pueden ser lineales o epítopos conformacionales. Un epítipo lineal comprende un solo segmento de una secuencia primaria de una cadena de polipéptido. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o superpuestos. Los epítopos conformacionales comprenden aminoácidos reunidos por plegado del polipéptido, para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

Específicamente, los epítomos son al menos parte de moléculas relevantes para el diagnóstico, es decir, la ausencia o presencia de un epítomo en una muestra se correlaciona cualitativa o cuantitativamente ya sea con una enfermedad o con un estado de salud o con el estado de un proceso de fabricación o un estado ambiental y alimentario. Los epítomos también pueden ser al menos parte de moléculas terapéuticamente relevantes, es decir, moléculas que pueden ser diana del dominio de unión específica que cambia el curso de la enfermedad.

Los “alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales” preferidos son aquellos alérgenos o antígenos que ya han demostrado su capacidad de ser inmunológica o terapéuticamente relevantes o que lo son, en especial aquéllos en los que se ha probado su eficacia clínica.

Por otra parte, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención también pueden introducirse otras capacidades de enlace en las regiones del bucle estructural, por ejemplo capacidades de enlace para moléculas pequeñas, tales como fármacos o enzimas, sitios catalíticos de enzimas o sustratos enzimáticos o para un análogo del estado de transición de un sustrato enzimático.

Preferiblemente, el nuevo sitio de unión de antígeno en los bucles estructurales es ajeno a la inmunoglobulina no codificada. De esta manera, las dianas como moléculas efectoras o receptoras Fc se excluyen preferiblemente de las moléculas de enlace y la especificidad de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, los nuevos sitios de enlace de antígeno en los bucles estructurales se introducen por sustitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por el ácido nucleico seleccionado.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la modificación de al menos un nucleótido da como resultado una sustitución, delección y/o inserción de la inmunoglobulina codificada por dicho ácido nucleico.

La modificación de al menos una región del bucle puede dar como resultado una sustitución, delección y/o inserción de 1 o varios aminoácidos, preferiblemente una mutación puntual, intercambio de bucles enteros, más preferiblemente el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 30 aminoácidos.

También es preferible la mutación aleatoria dirigida al sitio. Con este método uno o varios residuos aminoácidos específicos del bucle se intercambian o introducen utilizando insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa, es preferible el uso de enfoques combinatorios.

Preferiblemente al menos una región del bucle se muta o modifica de forma aleatoria, semi-aleatoria, o en particular por métodos de mutagénesis aleatoria dirigida al sitio. Estos métodos pueden emplearse para hacer modificaciones de aminoácidos en posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En estos casos las posiciones se eligen al azar, o los cambios de aminoácidos se realizan utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pueden mutarse a alanina, en referencia al cribado de alanina. Estos métodos pueden acoplarse con enfoques de ingeniería más sofisticados que emplean métodos de selección para cribar niveles superiores de diversidad de secuencia. Un método preferido de acuerdo con la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente que comprende al menos una unidad de repetición de nucleótido que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3' o 5'-NNK-3'.

La molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente puede comprender las unidades repetitivas identificadas anteriormente, que codifican todos los aminoácidos de origen natural conocidos.

Como es bien conocido en la especialidad, hay una variedad de técnicas de selección que pueden emplearse para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas características y afinidades de enlace, incluyendo por ejemplo tecnologías de expresión tales como presentación en fago, presentación en ribosoma, presentación en superficies celulares y similares, como se describe a continuación. Los métodos para producción y cribado de variantes de anticuerpos son bien conocidos por la técnica. Los métodos generales para biología molecular de anticuerpos, expresión, purificación y cribado se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76.

Un “bucle estructural” o “bucle no-CDR” de acuerdo con la presente invención debe entenderse de la forma siguiente: las inmunoglobulinas están formadas de dominios con el llamado pliegue de la inmunoglobulina. En esencia, las hojas beta antiparalelas se conectan mediante bucles formando un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, varios de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión al antígeno. Estos bucles se denominan bucles CDR. Todos los otros bucles de dominios de anticuerpo contribuyen más bien a la estructura de la molécula y/o a la función efectora. Estos bucles se definen aquí como bucles estructurales o bucles no-CDR.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las inmunoglobulinas modificadas (e incluidas siempre a través de toda la especificación siguiente: fragmentos de inmunoglobulina) pueden clonarse en células huésped, expresadas y ensayadas para sus especificidades de enlace. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos y una variedad de métodos que pueden usarse en la presente invención se describen en *Molecular Cloning*-

A Laboratory Manual, 3.^{sup}.rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar dichas inmunoglobulinas. Los vectores de expresión comprenden típicamente una inmunoglobulina enlazada operativamente que se coloca en una relación funcional, con control de secuencias reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier socio de fusión y/o elementos adicionales. Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se pueden producir por cultivo de una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas modificadas, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de las inmunoglobulinas modificadas. Los métodos de introducción de moléculas de ácido nucleico exógenas en un huésped son bien conocidas por la técnica y variarán según el huésped empleado. Por supuesto, también se pueden emplear sistemas de expresión libre celular o acelular para la expresión de inmunoglobulinas modificadas.

En una modalidad preferida de la presente invención, las inmunoglobulinas modificadas se purifican o aíslan después de la expresión. Las inmunoglobulinas modificadas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los especialistas en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis, filtración, concentración y cromatofocalización. La purificación se puede facilitar a menudo mediante un socio de fusión particular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser purificados utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GTS, usando cromatografía de afinidad Ni^{+2} si se emplea un His-tag o usando un anticuerpo anti-flag inmovilizado y se utiliza un flag tag. Como guía general sobre técnicas de purificación apropiadas, véase Antibody Purification: Principles and Practice, 3.^{sup}.rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. Por supuesto, también es posible expresar las inmunoglobulinas codificadas de acuerdo con la presente invención en la superficie de un huésped, en particular en la superficie de una célula bacteriana, de insecto o de levadura o en la superficie de fagos o virus.

Las inmunoglobulinas modificadas se pueden cribar utilizando una variedad de métodos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, los que utilizan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y técnicas de selección. Las técnicas de automatización y cribado de alto rendimiento pueden utilizarse en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear un socio o etiqueta de fusión, por ejemplo un enzima, una etiqueta inmune, una etiqueta isotópica o una etiqueta de molécula pequeña como un colorante fluorescente o colorimétrico o una molécula luminogénica.

En una modalidad preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas se criban en un ensayo *in vitro*. En una modalidad preferida, se criba la funcionalidad del anticuerpo, por ejemplo su capacidad de catalizar una reacción o su afinidad de enlace a su diana.

Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, incluyendo pero sin limitarse a etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicas.

Como se conoce en la técnica, un subconjunto de métodos de criba son aquellos métodos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se refieren aquí como "métodos de selección", y estos métodos se usan en la presente invención para el cribado de inmunoglobulinas modificadas. Cuando se criban las bibliotecas de inmunoglobulinas utilizando un método de selección, sólo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, es decir, que satisfacen algún criterio de selección, se propagan, aíslan y/u observan. Como se apreciará, debido a que se observan sólo las variantes más aptas, estos métodos permiten la criba de bibliotecas más grandes que las que se pueden cribar por métodos que analizan individualmente la aptitud de los miembros de bibliotecas. La selección es posible por cualquier método, técnica o socio de fusión que une de forma covalente o no covalente el fenotipo de inmunoglobulinas con su genotipo, que es la función de un anticuerpo con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de presentación en fagos como método de selección es permitido por la fusión de miembros de la biblioteca a la proteína gen III. De esta forma, la selección o el aislamiento de inmunoglobulinas modificadas que satisfacen algunos criterios, por ejemplo la afinidad del unión a la diana de la inmunoglobulina, también selecciona o aísla el ácido nucleico que la codifica. Una vez aislado, el gen o los genes que codifican las inmunoglobulinas modificadas pueden ser amplificados. Este proceso de aislamiento y amplificación, referido como selección por ciclos de adsorción-desorción puede repetirse, permitiendo que se enriquezcan las variantes de anticuerpo favorables en la biblioteca. La secuenciación del ácido nucleico del ácido nucleico unido permite finalmente la identificación del gen.

En la técnica se conoce una variedad de métodos de selección que se pueden usar en la presente invención para el cribado de bibliotecas de inmunoglobulina. Éstos incluyen, sin estar limitados a ellos, la presentación en fago (Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, Calif., 1996; Lowman *et al.*, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317) y infección selectiva de fago (Malmborg *et al.*, 1997, J Mol Biol 273:544-551), fagos infectivos selectivos (Krebber *et al.*, 1997, J Mol Biol 268:619-630) y selección por ciclos de adsorción-desorción de infectividad retardada (Benhar *et al.*, 2000, J Mol Biol 301:893-904), expresión en superficie celular (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399) tales como presentación en bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, Nat Biotechnol 15:29-34; Georgiou *et al.*, 1993, Trends Biotechnol 11:6-10; Lee *et al.*, 2000, Nat Biotechnol 18:645-648; Jun *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:576-80), levadura (Boder & Wittrup, 2000, Methods Enzymol 328:430-44; Boder & Wittrup, 1997, Nat Biotechnol 15:553-557) y células de mamífero (Whitehorn *et al.*, 1995, Bio/technology 13:1215-1219), así como tecnologías de presentación *in vitro* (Amstutz *et al.*, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:400-405) tales como expresión de polisoma (Mattheakis *et al.*, 1994, Proc Natl

Acad Sci USA 91:9022-9026) expresión de ribosoma (Hanes et al., 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942), expresión de ARNm (mRNA) (Roberts & Szostak, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-12302; Nemoto *et al.*, 1997, FEBS Lett: 414:405-408) y el sistema de expresión por inactivación de ribosoma (Zhou *et al.*, 2002, J Am Chem Soc 124, 538-543).

5

Otros métodos de selección que se pueden usar en la presente invención incluyen métodos que no se basan en expresión, como métodos *in vivo*, incluyendo pero sin limitarse a ellos, la criba citométrica y la expresión periplásmica (Chen *et al.*, 2001, Nat Biotechnol. 19:537-542), el ensayo de complementación de fragmentos de anticuerpo (Johnsson & Varshavsky, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95:12141-12146) y la criba de dos híbridos de levadura (Fields & Song, 1989, Nature 310:245-246) empleada en el modo de selección (Visintin *et al.*, 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11723-11728). En una modalidad alternativa, la selección se activa por un socio de fusión que se une a una secuencia específica en el vector de expresión, enlazándose así de forma covalente o no covalente al socio de fusión y al miembro de la biblioteca variante de Fc asociado, con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, los documentos PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702 y PCT WO 02/07466 describen un socio de fusión y una técnica tales, que se pueden usar en la presente invención. En una modalidad alternativa, se puede producir la selección *in vivo* si la expresión del anticuerpo imparte alguna ventaja de crecimiento, reproducción o supervivencia a la célula.

Un subconjunto de métodos de selección referidos como métodos de “evolución dirigida” son aquellos que incluyen el acoplamiento o desarrollo de secuencias favorables durante la selección, en ocasiones con la incorporación de nuevas mutaciones. Como apreciarán los expertos en la materia, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables en una biblioteca y pueden incrementar la diversidad de las secuencias que se criban. Una variedad de métodos de evolución dirigida conocidos en la técnica se puede usar en la presente invención para cribar variantes de anticuerpo, incluyendo pero sin limitarse a ellos, el barajado de ADN (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), el barajado de exones (patentes de los E.U.A. n° 6,365,377; Kolkman & Stemmer, 2001, Nat Biotechnol 19:423-428), el barajado de familias (Cramer *et al.*, 1998, Nature 391:288-291; la patente de los E.U.A. n° 6,376,246), RACHITT.TM (Coco *et al.*, 2001, Nat Biotechnol 19:354-359; PCT WO 02/06469), cebado aleatorio y “STEP” de recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat Biotechnol 16:258-261; Shao *et al.*, 1998, Nucleic Acids Res 26:681-683), ensamblaje de genes mediado por exonucleasa (patente de los E.U.A. n° 6,352,842; patentes de los E.U.A. n° 6,361,974), Gene Site Saturation Mutagenesis TM (Patente de los E.U.A. n° 6,358,709), Gene Reassembly.TM (Patente de los E.U.A. n° 6,358,709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi *et al.*, 2000, Gene 243:133-137) y tecnología de ingeniería de anticuerpos de evolución dirigida AMESystem (Applied Molecular Evolution) (patente de los E.U.A. n° 5,824,514; patente de los E.U.A. n° 5,817,483; patente de los E.U.A. n° 5,814,476; patente de los E.U.A. n° 5,763,192; patente de los E.U.A. n° 5,723,323).

Las variantes de los anticuerpos se pueden cribar utilizando uno o varios ensayos basados en células *in vivo*. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas se añaden típicamente de forma exógena, de tal manera que las células se exponen a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos, típicamente pero no siempre, se basan en la función de la inmunoglobulina; esto es, la capacidad del anticuerpo de unirse a su objetivo y mediar varios eventos bioquímicos, por ejemplo la función efectora, la inhibición de unión ligando/receptor, la apoptosis y similares. Estos ensayos a menudo incluyen el seguimiento de la respuesta de las células frente al anticuerpo, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, como la expresión celular de un gen natural o gen reportero. Por ejemplo estos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de los anticuerpos para producir ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesaria la adición de células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, puede ser necesario añadir, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras tales como monolitos de sangre periférica (PBMCs, del inglés peripheral blood monocytes), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente de humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Las inmunoglobulinas pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar el ataque en células diana por células inmunes que se han añadido al ensayo. Los métodos para el seguimiento de la muerte o la viabilidad celular son conocidos por la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción con caspasas pueden permitir la medición de la apoptosis y la absorción o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes, tales como el azul alamar pueden permitir el seguimiento del crecimiento o la activación celular. En una modalidad preferida, se puede emplear el ensayo de citotoxicidad basado en DELFIA.RTM.EuTDA (Perkin Elmer, MA) pueden emplearse. De forma alternativa, se puede seguir la muerte o el daño de las células diana midiendo el desprendimiento de uno o varios componentes intracelulares naturales, por ejemplo, la lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, se puede seguir la respuesta mediante el análisis de genes naturales o inmunoglobulinas que pueden ser reguladas al alza, por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleuquinas o de forma alternativa, se puede realizar la lectura mediante una construcción reportera. Los ensayos basados en células también pueden incluir la medición de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de inmunoglobulinas modificadas. Las células para estos ensayos pueden ser de tipo procariótico o eucariótico y se puede emplear una variedad de líneas celulares conocidas en la técnica. De forma alternativa, los tamices basados en células se elaboran usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, las variantes de anticuerpos no se añaden

de forma exógena a las células. Por ejemplo, en una modalidad, el tamiz basado en células utiliza la expresión en superficie celular. Puede emplearse un socio de fusión que permita la expresión de inmunoglobulinas modificadas en la superficie de las células (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).

- 5 En una modalidad preferida, la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas modificadas puede determinarse experimentalmente utilizando uno o varios ensayos basados en células. En una modalidad preferida, los ensayos de activación de células T *ex vivo* se emplean para cuantificar experimentalmente la inmunogenicidad. En este método, las células que presentan antígeno y las células T nativas de donantes apareados se prueban una o varias veces con un péptido o un anticuerpo entero de interés. Entonces, la activación de las células T puede detectarse utilizando una
10 variedad de métodos, por ejemplo haciendo el seguimiento de la producción de citoquinas o midiendo la absorción de timidina tritiada. En la modalidad más preferida, la producción de interferón gama se sigue utilizando ensayos Eilspot (Schmittel *et. al.*, 2000, J. Immunol. Meth., 24: 17-24).

- Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden caracterizarse
15 en experimentos en células, tejidos y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, a menudo los fármacos se ensayan en animales, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o un modelo de enfermedad o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden ser referidos como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos a menudo se prueban en ratones, incluyendo pero sin limitarse a ellos, ratones
20 desnudos, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo “knockins” y “knockouts”). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo que se debe utilizar como agente terapéutico. Cualquier organismo, preferiblemente los mamíferos, puede emplearse para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos apropiados y de esta manera pueden emplearse para analizar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad
25 de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. Finalmente se requieren pruebas en humanos para la aprobación como fármacos y por supuesto se contemplan estos experimentos. De esta manera, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ensayarse en humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

- Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden encontrar utilidad en un amplio rango de productos de anticuerpos. En una modalidad, la variante de anticuerpo de la presente invención se utiliza para la terapia o la profilaxis, para uso preparativo o analítico, como un compuesto de diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo de investigación, preferiblemente un agente terapéutico. La variante del anticuerpo puede utilizarse en una
30 composición de anticuerpos que es monoclonal o policlonal. En una modalidad preferida, se usa una inmunoglobulina modificada de la presente invención para exterminar células diana que contienen el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una modalidad alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo por antagonización de una citoquina o un receptor de citoquina. En una modalidad alternativa preferida las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y exterminar las células diana que contienen el antígeno
40 diana. En una modalidad preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y exterminar las células diana que contienen o requieren el antígeno diana. En una modalidad preferida alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

- Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden emplearse para diversos propósitos terapéuticos. En una modalidad preferida, un anticuerpo que comprende las inmunoglobulinas modificadas se administra a un paciente para tratar un desorden específico. Un “paciente” para los propósitos de la presente invención incluye tanto a humanos como a otros animales, preferiblemente mamíferos y más preferiblemente humanos. Aquí se entiende por
50 “desorden específico” un desorden que puede mejorar por la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

- En una modalidad, una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. De forma alternativa, la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o varios agentes terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a ellos, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores u otros agentes terapéuticos. Las inmunoglobulinas modificadas pueden administrarse de forma concomitante con uno e varios regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante del anticuerpo de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, con terapia de radiación o con ambas terapias de quimioterapia y radiación. En una modalidad, las
60 inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con uno o varios anticuerpos, que pueden o no comprender una variante del anticuerpo de la presente invención. De acuerdo con otra modalidad de la invención, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varias terapias anticáncer distintas se emplean para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser de utilidad en el trasplante de médula ósea y particularmente en trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan emplear en combinación con aún otras técnicas terapéuticas, como la cirugía.

Una variedad de otros agentes terapéuticos se puede usar para la administración con las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En una modalidad, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente anti-angiogénico, que es un compuesto que bloquea o interfiere en cierto grado en el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico, por ejemplo, puede ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión Fc, o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento involucrado en la estimulación de la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido aquí es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor). En una modalidad alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente terapéutico que induce o mejora la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que hace diana en CTLA-4. En una modalidad alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una modalidad alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se administran con una citoquina. Por "citoquina", tal y como se emplea aquí, se entiende un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo las quimioquinas.

Se contemplan composiciones farmacéuticas donde se formulan las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o varios agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de anticuerpo de la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza, con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se tienen que usar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las inmunoglobulinas modificadas y otros agentes terapéuticamente activos aquí descritos pueden formularse también como inmunoliposomas y/o atrapados en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención, preferiblemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse en una variedad de formas, incluyendo pero sin limitarse a ellas, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraóticamente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), en forma intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, la tecnología inhalable AERx™ comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de suministro pulmonar Inhance™ comercialmente disponible en Inhale Therapeutics), en forma vaginal, parenteral, rectal o intraocular.

Como se emplea aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a una reacción de enlace que es determinante del ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. De esta manera, bajo las condiciones designadas (por ejemplo, las condiciones de inmunoensayo en el caso de una inmunoglobulina), el anticuerpo especificado se une a su "diana" particular y no se une en cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. De forma comparable a las CDRs de anticuerpos, las regiones modificadas del bucle estructural son porciones de proteínas de unión de antígeno o de unión de molécula y no son antígenos como tales.

El término "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias control en enlace operativo, de manera que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector; sin embargo, el ADN relevante también puede estar integrado en el cromosoma huésped.

El sistema de expresión puede comprender un vector. Cualquier vector de expresión conocido en la técnica puede ser apropiado para este propósito.

La inmunoglobulina modificada se expresa preferiblemente en un huésped, preferiblemente en una célula bacteriana, de levadura, de planta, en una célula de animal o en una planta o en un animal.

Se puede emplear una amplia variedad de células huésped apropiadas para expresar la inmunoglobulina modificada, incluyendo pero no limitadas a células de mamíferos (células de animales), células de plantas, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), células de insecto y levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden ser de utilidad en la presente invención se describe en el catálogo de líneas celulares ATCC, disponible en American Type Culture Collection. Además, también pueden emplearse plantas y animales como huéspedes para la expresión de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención. La expresión así como los vectores o casetes de transfección pueden seleccionarse de acuerdo con el huésped empleado.

Por supuesto también se pueden emplear sistemas de expresión de proteínas libres de células o acelulares. Las plataformas de expresión de proteínas de transcripción/traducción *in vitro*, que producen cantidades suficientes de proteínas, ofrecen muchas ventajas de una expresión de proteínas libre de células, eliminando la necesidad de etapas laboriosas secuencia adelante y atrás (por ejemplo, transformación de célula huésped, cultivo, o lisis) típicamente asociadas con sistemas de expresión basados en células.

La inmunoglobulina o una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en una región del bucle estructural de la inmunoglobulina y que determina la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, se puede fabricar como sigue:

- se proporciona un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región del bucle,
- se modifica al menos un residuo nucleótido de al menos de una de dichas regiones del bucle,
- se transfiere dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- se expresa dicha inmunoglobulina modificada,
- la inmunoglobulina modificada expresada se pone en contacto con un epítipo,
- se determina si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo, y
- se proporciona el enlace de la inmunoglobulina modificada a dicho epítipo y opcionalmente se acaba en una preparación farmacéutica.

En particular, una inmunoglobulina multi-específica que se une de forma específica al menos a una primera molécula o a una preparación farmacéutica de la misma que comprende al menos una modificación en al menos una región del bucle estructural de dicha inmunoglobulina y determina el enlace específico de al menos una región del bucle a al menos una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, auto-antígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, donde la inmunoglobulina que contiene una región del bucle estructural no se une específicamente a al menos la segunda molécula como mínimo, se puede fabricar como sigue:

- se proporciona un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente al menos a una primera molécula que comprende al menos una región del bucle estructural,
- se modifica al menos un residuo nucleótido de al menos de una de dichas regiones del bucle codificada por dicho ácido nucleico,
- se transfiere dicho ácido nucleico modificado a un sistema de expresión,
- se expresa dicha inmunoglobulina modificada,
- la inmunoglobulina modificada expresada se pone en contacto con al menos una segunda molécula, y
- se determina si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula y
- se proporciona el enlace de la inmunoglobulina modificada al menos a dicha segunda molécula y opcionalmente se acaba en una preparación farmacéutica.

Se prefiere el diseño de más de una especificidad en un miembro de un par de enlace específico (Kufer *et al.* (2004) Trends in Biotechnology vol. 22 páginas 238-244).

Se han realizado numerosos intentos de producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales multiespecíficos, por ejemplo biespecíficos. Un problema en la producción de anticuerpos biespecíficos hechos de dos cadenas de polipéptido diferentes (cadena pesada y ligera) es la necesidad de expresar 4 cadenas diferentes (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) en una célula, dando como resultado numerosas combinaciones diferentes de moléculas que se tienen que separar de la molécula biespecífica deseada en la mezcla. Debido a su similitud, la separación de estas moléculas es difícil y costosa. Se han empleado numerosas técnicas para reducir al mínimo la ocurrencia de estos apareamientos indeseados (Carter (2001) Journal of Immunological Methods, vol 248, páginas 7-15).

Una solución al problema es la producción de una cadena de polipéptido con dos especificidades, como por ejemplo dos scFvs enlazados entre sí o la producción de los denominados diacuerpos. Estas moléculas han demostrado estar muy lejos del pliegue de una molécula natural y son notoriamente difíciles de producir (LeGall *et al.* (2004) Protein Engineering, Design & Selection vol 17 páginas 357-366).

Otro problema del presente desarrollo de anticuerpos biespecíficos es el hecho de que incluso si los anticuerpos precursores se unen bivalentemente a su socio de enlace respectivo (p.ej. IgG), el anticuerpo biespecífico resultante es monovalente para cada socio de enlace respectivo.

Las moléculas multiespecíficas preferidas de la presente invención resuelven estos problemas:

Es posible la expresión de una molécula biespecífica como cadena polipeptídica (un dominio Ig modificado con dos especificidades de unión, ver sección de ejemplos) que es más fácil de lograr que la expresión de las dos cadenas polipeptídicas de anticuerpo (Cabilly *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277 (1984)).

También se puede elaborar como una molécula tipo anticuerpo (es decir, hecha de dos cadenas de polipéptido) debido al hecho que la segunda especificidad se ubica en la parte no variable de la molécula; no hay necesidad de dos cadenas pesadas o ligeras diferentes. De esta manera, no hay posibilidad de un apareamiento erróneo de las dos cadenas.

Un anticuerpo de la presente invención puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera, que forman en conjunto una región variable que se une a un socio de enlace específico, pudiendo estar formada la segunda especificidad por un bucle modificado de cualquiera de los bucles estructurales ya sea de la cadena pesada o de la cadena ligera. El sitio de unión también puede estar formado por más de un bucle no-CDR que puede ser estructuralmente un vecino (ya sea en la cadena pesada o en la cadena ligera o en ambas cadenas).

El anticuerpo o derivado modificado puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo (p.ej. Fab, CH1-CH2, CH2-CH3).

Se puede unir de forma mono o multivalente a los socios de enlace o incluso con diferente valencia a socios de enlace diferentes, dependiendo del diseño.

Como hay numerosos bucles diferentes disponibles para la selección y el diseño de un sitio de enlace específico en las regiones no-CDR de las cadenas pesadas y ligeras, es posible diseñar derivados de anticuerpo con incluso más de dos especificidades sin los problemas anteriormente mencionados.

Los dominios de enlace específico dentro de una cadena de polipéptido se pueden conectar con o sin un péptido enlazador.

Algunas clases de anticuerpo pueden considerarse multiespecíficas, en particular biespecíficas, por naturaleza: se unen a un antígeno (que típicamente es, por ejemplo, una estructura extraña o una estructura asociada con cáncer) con la región variable y se unen a moléculas efectoras Fc con la parte Fc (por ejemplo, receptores Fc en diversas células inmunes o una proteína de complemento) permitiendo así efectos tales como ADCC, ADCP o CDC.

Las moléculas Fc efectoras se unen por la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina (para IgG1 consiste en los dominios CH2 y CH3) y se han descrito numerosos métodos para optimizar la función efectora al mejorar el enlace de la parte Fc de una molécula de anticuerpo ya sea por técnicas de glicoingeniería (patente de los E.U.A. n° 6,602,684) o por ingeniería de proteínas o bien directamente en Fc (US 2005/0054832), o indirectamente por ingeniería fuera de Fc (US 2005/0244403). Ambos, la unión de la región Fc al receptor Fc y/o la unión a las proteínas de complemento, tales como Cq1, se ha alterado por estas técnicas. Usualmente, se busca mejorar la afinidad de unión a estas moléculas Fc efectoras, ya que esto se correlaciona con funciones efectoras mejoradas.

Con la presente invención, es posible diseñar el enlace del anticuerpo a moléculas Fc efectoras fuera de la región de enlace Fc natural. Los bucles modificados en los dominios de anticuerpo diferentes a los bucles involucrados en la unión de moléculas Fc efectoras "naturales" se pueden seleccionar a partir de una biblioteca o se pueden diseñar para unirse a una o varias moléculas efectoras Fc. Un anticuerpo con dichos sitios de unión adicionales a molécula efectora Fc tendrá una avidez más fuerte a cierta molécula efectora o célula efectora que presenta una molécula efectora Fc y por lo tanto pueden tener un efecto aún más fuerte que los anticuerpos de glico-ingeniería o regiones Fc mejoradas de otra forma. Sin embargo, para ciertas modalidades de la presente invención, las características efectoras de un anticuerpo determinado que se tienen que modificar no deben cambiarse directamente sino que deben permanecer sin ser afectadas por la modificación en el bucle estructural de acuerdo con la presente invención.

Los fragmentos de anticuerpo tienen ciertas ventajas en comparación con los anticuerpos enteros. Los fragmentos usualmente tienen buenas propiedades de biodistribución y se pueden producir más fácilmente. Sin embargo, la mayoría de los diseños de fragmentos de anticuerpo carecen de funciones efectoras y tienen una vida media corta *in vivo* (Holliger P, *et al.* Nat. Biotechnol.(2005) 23:1126-36).

Ni los dominios CH1 ni C κ o C λ median funciones efectoras, lo que es la razón por la que Fabs no muestra ADCC, ADCP o CDC. El documento WO 02/44215 describe moléculas de enlace que consisten en el sitio de unión de antígeno de un anticuerpo y moléculas efectoras Fc de unión a péptido. De esta manera, se puede construir un fragmento de anticuerpo que presenta funciones efectoras. El péptido se incorpora en la molécula de enlace en una posición que no destruye la unión a antígeno ni la capacidad del péptido para unirse a una molécula efectora Fc.

Sin embargo, de acuerdo con la presente invención la unión a moléculas efectoras Fc puede realizarse con dominios de inmunoglobulina modificados que se han seleccionado para el enlace de molécula efectoras Fc de bibliotecas de secuencias de bucle aleatorio dentro de un patrón fijado de un dominio de inmunoglobulina. Por lo tanto, es posible seleccionar secuencias de bucle específicas que no se unirán a las moléculas efectoras Fc fuera del patrón del dominio Ig. Por lo tanto, los polipéptidos que resultan de la presente invención pueden consistir preferiblemente en más de 100 aminoácidos.

ES 2 320 374 T3

A fin de seleccionar la función efectora potencial de estos dominios de acuerdo con la presente invención, pueden seleccionarse bibliotecas de dominios mutantes CH2, C κ o C λ para unirse a receptores Fc y/o factores de complemento tales como C1q.

- 5 A fin de incrementar la vida media *in vivo* de una molécula que contiene o consiste en este dominio (por ejemplo CH1, CH2, CH3, CH4, C κ o C λ) se puede seleccionar la unión a FcRn con bibliotecas de dominios mutantes, por ejemplo CH1, CH2, CH3, CH4, C κ o C λ , de acuerdo con la presente invención.

10 Los receptores FcRn para selección pueden proporcionarse ya sea en la superficie de las células que expresan naturalmente los receptores respectivos o por expresión y purificación de la parte extracelular del receptor respectivo. Para el propósito de esta invención, una primera criba en FcRn puede seleccionar dominios mutantes que además pueden probarse *in vitro* y se pueden seguir caracterizando en experimentos FACS por unión a células que expresan el receptor FcRn. Además, se puede seguir caracterizando por clasificación del rango de afinidad del enlace con diversos FcRn recombinantes, isoformas y alotipos, por ejemplo, con técnicas de resonancia de plasmón de superficie.

15 La inmunoglobulina de la presente invención es de origen humano.

20 Como la inmunoglobulina modificada se puede emplear para diversos propósitos, en particular en composiciones farmacéuticas, la inmunoglobulina es preferiblemente de origen humano. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada también puede ser una inmunoglobulina quimérica.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención, la inmunoglobulina humana deriva de IgG, en particular de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

25 La inmunoglobulina modificada puede derivarse de una de las clases de inmunoglobulina identificadas anteriormente.

30 La inmunoglobulina comprende preferiblemente una cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina o una parte de la misma.

La inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o ligera, al menos un dominio variable y/o constante.

35 La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención comprende al menos un dominio constante de la inmunoglobulina o una parte de la misma incluyendo un minidominio.

40 Un dominio constante es una unidad de pliegue de la inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de inmunoglobulina, también referida como un dominio de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, C κ , C λ).

45 Una inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención consiste en un dominio constante que se selecciona del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C, Igl-C, o una parte de la misma que incluye un minidominio, con al menos una región bucle, y se caracteriza porque al menos una región del bucle comprende al menos una modificación de aminoácido que forma al menos una región del bucle modificada, en la que al menos dicha región modificada del bucle se une específicamente al menos a un epítopo de un antígeno.

El dominio constante se selecciona del grupo de los dominios CH1, CH2, CH3 o CH4, el dominio CL, el dominio C κ , C λ , un fragmento Fab o un fragmento Fc y sus combinaciones.

50 La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente puede comprender uno o varios dominios constantes (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez dominios). Si más de un dominio está presente en la inmunoglobulina modificada, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de tipos diferentes (por ejemplo, CH1-CH1-CH2, CH3-CH3). Por supuesto el orden de los dominios simples también puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, CH1-CH3-CH2, CH4-CH1-CH3-CH2).

55 Toda la numeración de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas sigue el esquema de numeración IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212; Ruiz *et al.*, 2000 Nucleic Acids Res. 28: 219-221; Lefranc *et al.*, 2001, Nucleic Acids Res. 29: 207-209; Lefranc. *et al.*, 2003, Nucleic Acids Res. 307-310; Lefranc *et al.*, 2005, Dev Comp Immunol 29:185-203).

60 De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención las regiones modificadas del bucle de CH1, CH2, CH3 y CH4 comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117.

65 Las regiones del bucle estructural de Igk-C y Igl-C de origen humano comprenden preferiblemente los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126.

Las regiones del bucle estructural del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano comprenden preferiblemente los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76 y los aminoácidos 89 a 101.

Las regiones de los aminoácidos anteriormente identificadas de las inmunoglobulinas respectivas comprenden las regiones del bucle que se tienen que modificar.

La unión específica de la inmunoglobulina modificada a la molécula se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo que consiste en ensayos inmunológicos, preferiblemente ensayos inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón superficial, espectroscopia de resonancia magnética nuclear con diferencia de transferencia de saturación, espectroscopia de resonancia magnética nuclear de transferencia NOE (trNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión de tejido, ensayos de unión de células vivas y ensayos de extracto celular.

Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a métodos basados en FRET (Transferencia de energía de resonancia-fluorescencia, del inglés Fluorescent Resonance Energy Transfer) y BRET (Transferencia de energía de resonancia-bioluminiscencia, del inglés Bioluminescence Resonance Energy Transfer), AlphaScreen.TM. (Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), ensayo de proximidad-escintilación, ELISA (Ensayo inmunosorbente ligado a enzima SPR (Resonancia de plasmón superficial, del inglés Surface Plasmon Resonance), también conocida como BIACORE.RTM.), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de cribado diferencial, electroforesis en gel y cromatografía incluyendo gel filtración. Éstos y otros métodos pueden aprovechar varios socios de fusión o etiqueta.

La inmunoglobulina modificada se conjuga preferiblemente con una etiqueta seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, etiquetas de enzimas, etiquetas radioactivas, etiquetas de color, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromogénicas, etiquetas luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

La inmunoglobulina modificada puede conjugarse con otras moléculas que permiten la detección simple de dicho conjugado, por ejemplo, en ensayos de unión (por ejemplo, ELISA) y estudios de unión.

Según una modalidad particularmente preferida de la presente invención la inmunoglobulina consiste en un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C, o una parte de los mismos incluyendo minidominios, o combinaciones de los mismos, con al menos una región del bucle, caracterizado porque al menos una región del bucle comprende al menos una modificación del aminoácido que forma al menos una región del bucle modificada, en la que al menos dicha región del bucle modificada se une específicamente al menos a un epítipo de un antígeno.

Se prefiere combinar molecularmente al menos un dominio del anticuerpo modificado (= enlace al socio específico mediante las secuencias no variables o el bucle estructural) con al menos otra molécula de enlace que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo modificado.

La molécula se selecciona del grupo que consiste en moléculas proteináceas, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Las regiones del bucle de las inmunoglobulinas modificadas pueden ligarse específicamente a cualquier tipo de moléculas de enlace, en particular a moléculas proteináceas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, carbohidratos, lípidos, pequeñas moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas. Por supuesto, las inmunoglobulinas modificadas pueden comprender al menos dos regiones del bucle, de manera que cada una de las regiones del bucle se puede unir específicamente a otras moléculas o epítopos.

De acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención el enlace de la molécula con la región modificada del bucle estructural se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados con tumor, en particular EpCAM, glicoproteína-72 asociada con tumor (TAG-72), el antígeno asociado con tumor CA 125, el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, del inglés Prostate specific membrane antigen), antígeno asociado con melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA, del inglés High molecular weight melanoma-associated antigen), antígeno asociado con tumor que expresa carbohidratos relacionado con Lewis Y, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado con tumor de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos virales, alérgenos, fluoresceína, lisozima, receptor 9 tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gama; TNF-alfa, TNFbeta2, TNF.alfa, TNFalfabeta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor TRAIL-1, receptor de adenosina A1, receptor de Linfotoxina Beta, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa5, integrina alfa6, integrina alfaV, integrina alfaVbeta3, FCFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina 1, Blas (estimulador de linfocito-B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelina, VLA-4, carbohidratos tales como antígenos de grupo sanguíneo y carbohidratos relacionados, glicosilación Galili, gastrina, receptores de gastrina, carbohidratos asociados con tumor, hapteno NP-cap o NIP-cap,

ES 2 320 374 T3

receptor de células T alfa/beta, E-selectina, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina testicular tipo PLAP, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta gH del citomegalovirus humano (HCMV), HIV gp120, HCMV, Virus sincitial respiratorio RSV F, RSVF Fgp, VNRintegrina, Hep B gp120, CMV, gpIIbIIIa, bucle HIV IIIB gp120 V3, virus sincitial respiratorio (RSV) Fgp, glicoproteína gD del virus del Herpes simplex (HSV), glicoproteína HSV gB, glicoproteína de la cubierta HCMV gB, toxina *Clostridium perfringens* y sus fragmentos.

La inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención se puede unir preferiblemente a una de las moléculas descritas anteriormente. Estas moléculas comprenden también alérgenos.

De acuerdo con otra modalidad preferida de la presente invención se modifican los residuos aminoácido de las posiciones 15 a 17, 29 a 34, 85.4 a 85.3, 92 a 94, 97 a 98 y/o 108 a 110 de CH3.

La modificación de la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una delección, una sustitución o una inserción.

De acuerdo con la presente invención se eliminan al menos 1, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 15 aminoácidos, substituyendo con otros aminoácidos (también con aminoácidos modificados) o se insertan en la región del bucle de la inmunoglobulina. Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en la región del bucle de una inmunoglobulina no puede exceder el número de 30, preferiblemente 25, más preferiblemente 20 aminoácidos. La sustitución y la inserción de los aminoácidos se realiza preferiblemente de forma aleatoria por métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente solicitud de patente.

La inmunoglobulina de acuerdo con la invención se corresponde con una modalidad específica caracterizada porque la región CH3 comprende SEC ID N°. 16 o SEC ID N°. 18, cuando EpCam se une a dicha inmunoglobulina, SEC ID N°. 20, cuando la fluoresceína se une a la inmunoglobulina, SEC ID N°. 22, 24, 26, 28, 30 a 32, cuando la lisozima se une a dicha inmunoglobulina, SEC ID N°. 34, 36, 38 o 40, cuando TLR9 se une a la inmunoglobulina, y SEC ID N°. 42, cuando el lisozima y/o la eritropoyetina se unen a dicha inmunoglobulina.

De acuerdo con una modalidad específica de la invención la inmunoglobulina se caracteriza por comprender la SEC ID n° 44 o SEC ID n° 46, cuando la lisozima y gp41 se unen a dicha inmunoglobulina.

La inmunoglobulina modificada se conjuga preferiblemente con una molécula etiqueta o reporter seleccionada entre el grupo que consiste en moléculas orgánicas, etiquetas enzimáticas, etiquetas radioactivas, etiquetas coloreadas, etiquetas fluorescentes, etiquetas cromogénicas, etiquetas luminescentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas con etiquetas como se especifica anteriormente, se pueden emplear, por ejemplo, en métodos de diagnóstico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se obtiene por un método de acuerdo con la presente invención para la preparación de una vacuna para la inmunización activa. De esta manera, la inmunoglobulina se utiliza como un fármaco antigénico para formular una vacuna o bien se utiliza para la captura o pesca de estructuras antigénicas para el uso en la formulación de una vacuna.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, para la preparación de una biblioteca de proteínas de inmunoglobulinas.

La inmunoglobulina de la presente invención se puede usar en un método para la unión y/o detección específica de una molécula que comprende las etapas de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra de ensayo que se sospecha que contiene dicha molécula, y

(b) detección de la formación potencial de un complejo específico molécula/inmunoglobulina.

La inmunoglobulina de la presente invención se puede usar en un método para el aislamiento específico de una molécula que comprende las etapas de:

(a) puesta en contacto de una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, con una muestra de ensayo que se contiene dicha molécula, y

(b) separación del complejo específico molécula/inmunoglobulina formado, y

(c) opcionalmente, aislamiento de la molécula de dicho complejo.

Las inmunoglobulinas según la invención pueden emplearse para aislar específicamente moléculas a partir de una muestra. Si se emplean inmunoglobulinas multiespecíficas, puede aislarse más de una molécula de una muestra. Es especialmente ventajoso utilizar inmunoglobulinas modificadas en estos métodos, porque permite, por ejemplo, generar una matriz con una superficie homogénea con cantidades definidas de socios de unión (es decir, inmunoglobulinas modificadas) inmovilizadas allí, que son capaces de unirse a las moléculas que se tienen que aislar. En contraste a ello, si se usan socios de enlace monoespecíficos no se puede generar una matriz homogénea debido a que los socios de enlace sencillos no se unen con la misma eficacia a la matriz.

La inmunoglobulina según la invención se puede emplear en un método para hacer blanco a un compuesto con una diana, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención o una inmunoglobulina modificada que se puede obtener por un método de acuerdo con la presente invención, capaz de unirse específicamente a dicho compuesto,

(b) suministrar el complejo compuesto/inmunoglobulina a la diana.

Las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención pueden emplearse para suministrar al menos un compuesto ligado a las regiones CDRs y/o modificadas del bucle a una diana. Estas inmunoglobulinas pueden emplearse para hacer diana en sustancias terapéuticas en un sitio de acción preferido en el curso del tratamiento de una enfermedad.

La inmunoglobulina según la presente invención o que se puede obtener de acuerdo con la presente invención puede ser parte de una biblioteca de proteínas.

Los métodos preferidos para construir dicha biblioteca pueden encontrarse arriba y en los ejemplos. La biblioteca de acuerdo con la presente invención puede emplearse para identificar inmunoglobulinas que se unen a una molécula distinta.

La biblioteca de proteínas que comprende una inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención o que se puede obtener por el método de acuerdo con la presente invención, se puede usar para el diseño de derivados de inmunoglobulina.

Una inmunoglobulina existente se puede cambiar para introducir sitios de unión de antígeno en cualquier dominio o minidominio, usando una biblioteca de proteínas del dominio respectivo de al menos 10, preferiblemente 100, más preferiblemente 1000, más preferiblemente 10000, más preferiblemente 100000, más preferiblemente más de 1000000 dominios variantes, con al menos un bucle modificado. Después la biblioteca se criba para la unión al antígeno específico. Después de la caracterización molecular para las propiedades deseadas, el dominio o minidominio seleccionado se clona en la inmunoglobulina original mediante técnicas de ingeniería genética, de tal manera que reemplaza la región de tipo salvaje. De forma alternativa, sólo se puede cambiar la codificación de ADN para los bucles o la codificación para los aminoácidos mutados para obtener una inmunoglobulina con el sitio de unión adicional para el antígeno específico.

La elección del sitio para el bucle estructural anti-específico mutado depende de la estructura de la inmunoglobulina original y del propósito del sitio de unión adicional. Si, por ejemplo, la molécula original es una inmunoglobulina completa que necesita tener insertado un sitio de unión de antígeno adicional sin perturbación de la función efectora, los bucles a modificar se seleccionarán a partir de dominios distantes de CH2 y CH3, que son los socios de unión naturales para las moléculas efectoras Fc. Si la inmunoglobulina original es una Fab, es posible la modificación de bucles en dominios constantes de las cadenas ligeras o las cadenas pesadas o los dominios variables respectivos. Para generar una biblioteca se pueden preparar bibliotecas de moléculas originales mutantes que tienen mutaciones en uno o varios bucles estructurales de uno o varios dominios. La selección con moléculas originales mutadas completas puede tener ciertas ventajas, ya que la selección para la unión de antígeno con un bucle estructural modificado proporcionará las modificaciones estéricamente ventajosas si también se analizan para las otras propiedades que deberá mostrar la inmunoglobulina mutada.

El requerimiento de tamaño (es decir, el número de variantes de proteínas) de una biblioteca de proteínas de un dominio o un minidominio mutado o una molécula de fusión depende de la tarea. En general, una biblioteca para generar un sitio de unión de antígeno de novo requiere ser mayor que una biblioteca empleada para modificar adicionalmente un sitio de unión de antígeno diseñado ya existente, hecho de un bucle estructural modificado (por ejemplo, para mejorar la afinidad o cambiar la especificidad fina al antígeno).

La biblioteca de inmunoglobulinas o una biblioteca de ácidos nucleicos comprende numerosas inmunoglobulinas, por ejemplo un dominio constante, un minidominio y/o al menos una región del bucle estructural contenida en un minidominio, o moléculas de ácido nucleico que los codifican. La biblioteca contiene miembros con diferentes modificaciones, en que la pluralidad se define por las modificaciones en al menos una región del bucle estructural. La biblioteca de ácidos nucleicos incluye preferiblemente al menos 10 miembros diferentes (que dan como resultado el intercambio de un aminoácido) y más preferiblemente incluye al menos 100, más preferiblemente 1000 o 10000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñados por estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). También son

preferibles números de miembros individuales incluso más diversificados, tales como al menos 1000000 o al menos 10000000.

5 Dos dominios o minidominios diferentes seleccionados a partir de al menos dos bibliotecas de acuerdo con la invención se pueden usar en combinación a fin de generar inmunoglobulinas multiespecíficas. Estas inmunoglobulinas específicas seleccionadas se pueden combinar entre sí y con otras moléculas, de forma similar a bloques de construcción, para diseñar la disposición óptima de los dominios o minidominios para obtener las propiedades deseadas.

10 Además, una o varias inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la invención pueden introducirse en varios o en todos los sitios diferentes de una proteína posible sin destruir la estructura de la proteína. Mediante esta técnica de “barajado de dominios” se crean nuevas bibliotecas que a su vez pueden seleccionarse para las propiedades deseadas.

15 Una biblioteca puede contener inmunoglobulinas de acuerdo con la invención, seleccionadas del grupo que consiste en dominios de una inmunoglobulina, mini dominios o sus derivados.

20 Una modalidad preferida de la presente invención es una molécula de unión para un antígeno (molécula de unión de antígeno) que comprende al menos un dominio de inmunoglobulina y una región del bucle estructural que se modifica de acuerdo con la presente invención para unir el antígeno, en que dicha molécula de unión no comprende dominios variables de un anticuerpo. Puede comprender otras partes utilizables para las actividades del anticuerpo (por ejemplo, como regiones efectoras naturales o modificadas (secuencias); sin embargo, carece de la región de unión “natural” de anticuerpos, es decir, los dominios variables en sus posiciones de origen natural. Estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención tienen las ventajas descritas anteriormente para las presentes moléculas, aunque sin la actividad de unión específica de los anticuerpos; sin embargo, con una actividad de unión específica recientemente introducida en la región del bucle estructural.

25 Preferiblemente, estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C y sus combinaciones; dichas combinaciones comprenden al menos dos, preferiblemente al menos cuatro, especialmente al menos seis dominios constantes y al menos una región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente estas regiones del bucle estructural se conectan mediante la región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención o bien mediante los bucles estructurales que están presentes naturalmente presentes entre estos dos dominios constantes. Una modalidad de estas moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención consiste de la región Fc de un anticuerpo con al menos una modificación en un bucle estructural de acuerdo con la presente invención. También para las moléculas de unión de antígeno de acuerdo con la presente invención se prefiere que los nuevos sitios de unión de antígeno en los bucles estructurales se introduzcan por tecnologías de aleatorización, es decir, intercambiando uno o varios residuos aminoácido del bucle por técnicas de aleatorización o introduciendo insertos generados aleatoriamente en dichos bucles estructurales. De forma alternativa se prefiere el uso de enfoques combinatorios.

40 Una inmunoglobulina modificada puede tener un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada e incorporado en uno o varios bucles estructurales. El término “ajeno” significa que el sitio de unión de antígeno no se forma naturalmente mediante la región específica de la inmunoglobulina, y un socio de unión ajeno, pero no el socio de unión natural de una inmunoglobulina, se une por el sitio de unión del antígeno. Esto significa que un socio de unión como un receptor Fc o un efector del sistema inmune, no se considera ligado por el sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina no modificada.

45 Preferiblemente, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en antígenos patógenos, antígenos asociados a tumor, enzimas, substratos, autoantígenos, moléculas orgánicas o alérgeno. Más preferiblemente, los antígenos se seleccionan del grupo que consiste en antígenos virales, antígenos bacterianos o antígenos de patógenos de eucariotas o fagos. Los antígenos virales preferidos incluyen antígenos de los virus HAV, HBV, HCV, HIV I, HIV II, Parvovirus, Gripe, HSV, Hepatitis, Flavivirus, virus del Nilo Occidental, virus Ébola, virus pox, virus de la viruela, virus del sarampión, virus del Herpes, Adenovirus, virus del Papiloma, virus del Polioma, Parvovirus, Rinovirus, virus Cocksackie, virus de la Polio, Ecovirus, virus de la Encefalitis Japonesa, virus del Dengue, virus de la Encefalitis transportado por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, virus de La Crosse, virus de Lassa, virus de la Rabia, Rotavirus; los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos de Pseudomonas, Micobacterias, Estafilococos, Salmonela, Meningococos, Borelia, Listeria, Neisseria, Clostridium, Escherichia, Legionela, Bacilos, Lactobacilos, Streptococos, Enterococos, Corynebacterium, Nocardia, Rhodococcus, Moraxella, Brucella, Campylobacter, Cardiobacterium, Francisella, Helicobacter, Haemophilus, Klebsiella, Shigella, Yersinia, Vibrio, Chlamydia, Leptospira, Rickettsia, Micobacterias, Treponema, Bartonella. Los antígenos eucarióticos preferidos de eucariotas patógenas incluyen antígenos de Giardia, Toxoplasma, Cyclospora, Cryptosporidium, Trichinella, Levaduras, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Blastomyces, Histoplasma, Coccidioides.

Las inmunoglobulinas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos dos sitios de unión de antígeno, el primer sitio enlaza a un primer epítipo, el segundo sitio enlaza a un segundo epítipo.

65 De acuerdo con una modalidad preferida, la presente inmunoglobulina comprende al menos dos regiones del bucle, la primera región del bucle une a un primer epítipo, y la segunda región del bucle liga a un segundo epítipo. Tanto al menos la primera como al menos la segunda región del bucle o ambas pueden contener un bucle estructural. Las inmunoglobulinas de acuerdo con la presente invención incluyen fragmentos de ellas conocidos en la técnica que

son funcionales, que contienen los elementos esenciales de acuerdo con la presente invención: la región del bucle estructural modificada de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, la inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención está compuesta de al menos dos dominios de inmunoglobulina, o una parte de los mismos que incluye un minidominio y cada dominio contiene al menos un sitio de unión de antígeno.

Una inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede comprender al menos un dominio de la región constante o una parte del mismo que incluye un minidominio. De esta manera, un dominio variable que, por ejemplo, se modifica en la región C-terminal o el dominio variable enlazado a una región CH1 modificada, por ejemplo un minidominio CH1 modificado, es una de las modalidades preferidas.

La inmunoglobulina preferida de acuerdo con la invención comprende un dominio que tiene al menos un 50% de homología con el dominio no modificado.

El término “homología” indica que los polipéptidos tienen los mismos residuos o residuos conservados en una posición correspondiente en su estructura primaria, secundaria o terciaria. El término también se extiende a las o más secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos homólogos.

“Dominio de inmunoglobulinas homólogo” significa un dominio de inmunoglobulina de acuerdo con la invención que tiene al menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de dominio de inmunoglobulina de secuencia nativa de longitud completa o cualquier otro fragmento de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí. Preferiblemente, un dominio de inmunoglobulina homólogo tendrá al menos aproximadamente un 50% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 55% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 65% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a una secuencia de dominio de inmunoglobulina nativa, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de dominio de inmunoglobulina de longitud completa como se describe aquí.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de dominio de inmunoglobulina aquí identificadas, se define como el porcentaje de residuos aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácido en la secuencia de dominio de inmunoglobulina específica, después de alinear la secuencia e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la destreza en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se comparan.

Los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se pueden obtener como se describe a continuación al utilizar el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a los valores predefinidos. Aquellos valores no ajustados a los valores predefinidos, es decir, los parámetros ajustables, se definen con los valores siguientes: overlap span=1, overlap fraction=0,125, Word threshold (T)=11, y scoring matrix=BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos al dividir (a) el número de residuos aminoácidos idénticos que se corresponden con la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés que tiene una secuencia derivada del dominio de inmunoglobulina nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se compara el dominio de inmunoglobulina de interés que puede ser el dominio de inmunoglobulina no modificado) como se determina por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos aminoácido de las partes no aleatorias del dominio de la inmunoglobulina de interés. Por ejemplo, en la declaración “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos frente a la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés.

La inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención puede emplearse para cualquier propósito conocido en la técnica para inmunoglobulinas, pero también permite aplicaciones que dependen de la combinación de especificidades introducidas por la presente invención. De acuerdo con esto, las inmunoglobulinas según la presente invención se emplean preferiblemente para uso terapéutico y preventivo (por ejemplo, como inmunoterapia activa o pasiva); para uso preparativo y analítico y para uso diagnóstico.

La inmunoglobulina de la presente invención se puede usar en un kit de socios de unión que contiene

(a) una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio de unión de antígeno ajeno a la inmunoglobulina incorporada en uno o varios bucles estructurales, y

(b) una molécula de unión que contiene un epítipo de dicho antígeno.

Una molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención se puede emplear para identificar la especificidad de la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención. Al utilizar la molécula de unión de este kit de acuerdo con la presente invención, se puede determinar la potencia de las inmunoglobulinas modificadas de acuerdo con la presente invención.

La potencia como aquí se define, es la propiedad de enlace de la molécula modificada a su antígeno. El enlace puede determinarse cuantitativa y/o cualitativamente en términos de especificidad y/o afinidad y/o avidez, como se emplea para propósitos de control de calidad.

Además, la molécula de unión de un kit de acuerdo con la presente invención puede emplearse para seleccionar la inmunoglobulina modificada de acuerdo con la presente invención a partir de una biblioteca que consiste en al menos 10, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos 10000, en especial al menos 100000 inmunoglobulinas con diferentes modificaciones en los bucles estructurales.

De acuerdo con la presente invención, una de las características clave de la presente invención es que el diseño de los dominios de inmunoglobulina se lleva a cabo en regiones que normalmente no están involucradas en la unión de antígeno, en otras palabras, en regiones distintas de los CDRs de un anticuerpo. Se observó que el pliegue específico de dominios de inmunoglobulina permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que estructuralmente son análogas a los CDRs pero diferentes en la posición en la secuencia. Las regiones identificadas por la presente invención son, como los CDRs, regiones del bucle que conectan las hebras beta del pliegue de la inmunoglobulina.

Más específicamente, aquí se describe que al introducir mutaciones aleatorias en los bucles que conectan las hebras beta A-B y E-F de un dominio IgG1 CH3 humano, se seleccionaron dominios CH3 mutados que se unen específicamente a un péptido 9 receptor tipo Toll (TLR-9) o a una lisozima de huevo de gallina, que son un péptido y una proteína respectivamente que normalmente no son reconocidos y unidos por dominios CH3 humanos de IgGL. Las mutaciones introducidas por nosotros incluyen mutaciones en las que los residuos aminoácidos seleccionados en la secuencia salvaje se reemplazaron por residuos seleccionados aleatoriamente, y también incluyen inserciones de residuos aminoácido extra en los bucles anteriormente mencionados.

Por analogía los dominios de inmunoglobulina de cualquier clase de inmunoglobulinas y de inmunoglobulinas de cualquier especie son susceptibles a este tipo de ingeniería. Además, no sólo se pueden manipular los bucles específicos objetivo de la presente invención, sino que cualquier bucle que conecta hebras beta en dominios de inmunoglobulina puede ser manipulado de la misma forma.

Los dominios de inmunoglobulina diseñados a partir de cualquier organismo y de cualquier tipo de inmunoglobulina pueden emplearse de acuerdo con la presente invención ya sea como tales (como dominios sencillos), o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de una inmunoglobulina intacta, que de acuerdo con esto tendrá su región de unión de antígeno "normal" formada por los 6 CDRs y la nueva región de unión de antígeno diseñada. Como esto, se puede generar una inmunoglobulina multiespecífica, por ejemplo biespecífica. Los dominios de inmunoglobulina diseñados también pueden formar parte de cualquier proteína de fusión. El uso de estos dominios de inmunoglobulina diseñados se encuentra en el campo general del uso de inmunoglobulinas.

Los dominios de las siguientes inmunoglobulinas se entienden aquí como dominios de inmunoglobulina:

para IgG, IgD e IgA: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3

para IgM e IgE: VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3, CH4

1. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en un lado, es decir, ya sea en bucles que conectan hebras beta B-C, D-E o F-G (la "punta", con la excepción de dominios variables que están cubiertos por muchas patentes) o hebras beta A-B, C-D, (C-C' y C"-D en el caso de dominios variables) o E-F (el "fondo"). Se pueden aleatorizar los bucles sencillos o cualquier combinación de bucles. Pueden cambiarse, eliminarse o insertarse residuos adicionales.

2. Dominios de inmunoglobulina sencillos aleatorizados en ambos lados, la punta y el fondo.

3. Cualquier proteína que contiene uno de los dominios sencillos aleatorizados, tales como:

a) dímeros de "CH3 de cadena sencilla" (scCH3), scCH2, scCH1/CL, aleatorizados en uno o ambos lados

b) Fv de cadena sencilla aleatorizados en el "fondo", es decir, en el lado opuesto a los CDRs

ES 2 320 374 T3

- c) fragmentos Fab aleatorizados en el “fondo”, es decir, en el extremo C-terminal del dominios CH1 y del CL
- d) fragmentos Fc (es decir, proteínas que consisten en CH2-CH3) aleatorizadas en uno o ambos lados
- e) inmunoglobulinas completas aleatorizadas en el fondo de Fc
- f) otros dominios convenientes.

Las ventajas primarias de los dominios sencillos: son muy similares a todos los argumentos que se utilizan para estimular las moléculas VH de camello (“nanocuerpos” (nanobodies), ver www.ablynx.com). Los dominios de inmunoglobulina aleatorizados son proteínas muy pequeñas (peso molecular aproximado 12-15 kDa, dependiendo del número de residuos aminoácido insertados) y por tanto tendrán las siguientes ventajas en comparación con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos convencionales tales como scFv y Fabs: reconocer epítomos no comunes u ocultos, unirse en cavidades o sitios activos de dianas de proteína, facilidad de fabricación, y muchos otros. En el caso de un dominio de inmunoglobulina que está aleatorizado en ambos lados, puede generarse una molécula bivalente o biespecífica. Las ventajas principales de los dominios sencillos como parte de proteínas de fusión son las propiedades de enlace adicionales que pueden diseñarse en cualquier otra proteína.

Se contempla que cualquier sistema de expresión pueda emplearse para hacer proteínas. Una analogía a los dominios sencillos como se describe aquí se puede encontrar en los anticuerpos del camello, que sólo tienen un VH pero ningún VL. En estas proteínas, solo 3 CDRs (en lugar de 6 como en los anticuerpos “normales” son responsables de la unión de antígeno).

Las siguientes referencias de patentes se incorporan aquí por referencia como si se establecieran en su totalidad:

Patente de los E.U.A. N° 6,294,654 “Modified immunoglobulin molecule incorporating an antigen in a non-CUD loop region”

Patente de los E.U.A. N° 5,844,094 “Target binding polypeptide”

Patente de los E.U.A. N° 5,395,750 “Methods for producing proteins which bind to predetermined antigens”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0071690 “High avidity polyvalent and polyspecific reagents”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0018508 “Surrogate antibodies and methods of preparation and use thereof”

Patente de los E.U.A. N° 2003/0157091 “Multi- functional proteins”

Patente de los E.U.A. N° 2003/0148372 “Method to screen phage display libraries with different ligands”

Patente de los E.U.A. N° 2002/0103345 “Bispecific immunoglobulin-like antigen binding proteins and method of production”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0097711 “Immunoglobulin superfamily proteins”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0082508 “Secreted proteins”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0063924 “Secreted proteins”

Patente de los E.U.A. N° 2004/0043424 “Immunoglobulin superfamily proteins”

Patente de los E.U.A. N° 5,892,019 “Production of a single-gene-encoded immunoglobulin”

Patente de los E.U.A. N° 5,844,094 “Target binding polypeptide”

La presente invención además se ilustra en las siguientes figuras y ejemplos sin estar restringida a ellos.

La Figura 1a muestra la estructura de una IgG1 intacta. Los dominios se indican con flechas.

La Figura 1b ilustra la organización estructural de los monómeros principales del isotipo de la inmunoglobulina humana. Los enlaces disulfuro se muestran como líneas, los grupos carbohidratos N-enlazados se muestran como círculos.

La Figura 2 muestra el pliegue de la inmunoglobulina para un dominio constante (izquierdo) y uno variable (derecho) de una inmunoglobulina. Las hebras beta se indican mediante flechas.

La Figura 3 muestra un modelo molecular del dominio diseñado CH3 de acuerdo con la presente invención, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente. La superficie está en un círculo.

La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los PCRs utilizados para la producción de los fragmentos empleados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado. Los cebadores PCR se indican mediante flechas con su orientación 5'-3' respectiva, y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas de los sitios de restricción introducidos que se emplearon para el ensamblaje del gen mutado. Los siguientes sitios de restricción están contenidos en los cebadores para las ligaciones de los fragmentos PCR: CH3LNCO: NcoI; CH3LSAC y CH3CSAC: SacI; CH3CHIN y CH3RHIN: HindIII; CH3RNOT: NotI.

La Figura 5 muestra algunos ejemplos de cómo pueden utilizarse los dominios de la inmunoglobulina de la presente solicitud. Las regiones aleatorizadas se indican mediante un símbolo de estrella. Las especificidades de las regiones aleatorizadas en una molécula pueden ser idénticas o diferentes.

La Figura 6 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico de ingeniería. Los nombres de los cebadores se dan en casillas y las flechas indican la dirección en la que se alargan los cebadores. Las casillas con líneas inclinadas indican las posiciones relativas de las regiones que se aleatorizan en esta construcción, las casillas con líneas verticales indican las posiciones relativas de las regiones que se introdujeron para la generación del clon C24, y se indican los sitios de restricción empleados para el procedimiento de clonación.

La Figura 7 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 biespecífico diseñado. La secuencia de nucleótidos y su traducción se muestra en el diseño básico del dominio CH3 biespecífico diseñado. Las secuencias rojas indican regiones aleatorizadas a fin de generar la construcción biespecífica, mientras que las casillas verdes indican regiones en las que la secuencia se aleatorizó a fin de generar el clon C24.

La Figura 8 muestra el listado de secuencia de las secuencias aquí descritas.

Descripción de ejemplos específicos

Ejemplo 1

Construcción de la biblioteca de CH3 y expresión en superficie de fago

La estructura cristalina de un fragmento IgG1 Fc, que se publica en la Base de Datos Brookhaven como entrada 1OQO.pdb se usó para ayudar en el diseño del dominio CH3 mutado.

La secuencia que se utiliza como base para la construcción de la biblioteca CH3 se indica en la SEC ID N° 1. En esta secuencia, el primer aminoácido corresponde a Prolina 343 de la cadena A de la entrada loqo.pdb de la base de datos Brookhaven. El último residuo contenido en loqo.pdb es Serina 102 de la SEC ID N° 1. Después del análisis detallado de la estructura de loqo.pdb y mediante la inspección visual de los residuos que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los residuos 17, 18 y 19, que son parte del bucle que conecta la hebra A-B así como 71, 72, 73, 76 y 77, que son parte del bucle que conecta a la hebra beta E-F de SEC ID N° 1. Un modelo molecular del dominio CH3 diseñado, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible a solvente se muestra en la Figura 3. El gen diseñado se produjo mediante una serie de reacciones PCR seguidas por ligación de los productos PCR resultantes. Para facilitar la ligación, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica para SEC ID N° 1 se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para la inserción en el vector de clonación pHEN1 (Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19 (15):4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G.) en cuadro con la señal de secreción pElB, los residuos nucleótidos extra que codifican Met-Ala se conectaron en el extremo 5' de la secuencia para crear un sitio de restricción NcoI. Para los residuos aleatorizados, se eligió el codón NNS (código IUPAC, donde S significa C o G) que codifica todos los 20 aminoácidos de origen natural, pero se evitan 2 de 3 codones de parada. La secuencia diseñada se indica como una secuencia de nucleótido en SEC ID N° 2 y como una secuencia de aminoácidos en SEC ID N° 3. La letra X en SEC ID N° 3 representa residuos aminoácido aleatorizados. Las secuencias de los cebadores PCR utilizados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado se indican en SEC ID N° 4 a 9. La Figura 4 muestra una presentación esquemática de los fragmentos PCR generados para el ensamblaje del gen mutado y los cebadores empleados para eso.

El ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer M, Kohl J, Rüker F. Nucleotide sequences of the cD-NAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41. Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25; 18(16):4927) se usó como patrón para las reacciones PCR. Los 3 productos PCR se digirieron con SacI y/o HindIII respectivamente y ligaron en conjunto. El producto de ligación se digirió adicionalmente con NcoI y NotI y se ligó en el vector fagémido pHEN1 de expresión de superficie, que previamente se digirió con NcoI y NotI. Un número de clones seleccionados se controló por análisis de restricción y por secuenciado de ADN y se encontró que contienen el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas de forma correcta. Para las siguientes etapas de preparación del fago se siguieron protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transformó en células TGI de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, las partículas del fago se rescataron de células TG1 de *E. coli* con el fago M13-KO7 auxiliar. Después las partículas del fago se precipitaron a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se usaron para la selección por ciclos o, de forma alternativa, se almacenaron a menos 80°C.

ES 2 320 374 T3

Ejemplo 2

Construcción de la biblioteca CH3+3

- 5 Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción esta indica en SEC ID N° 10, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEC ID N° 11 y los cebadores empleados para la construcción fueron SEC ID N° 4-7, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 12.

10 Ejemplo 3

Construcción de la biblioteca CH3+5

- 15 Esta biblioteca se construyó y clonó de la misma forma que la biblioteca CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se indica en SEC ID N° 13, la secuencia de nucleótidos correspondiente en SEC ID N° 14, y los cebadores empleadas para la construcción fueron SEC ID N° 4-7, SEC ID N° 9 y SEC ID N° 15.

Ejemplo 4

- 20 *Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca CH3-fago en el péptido TLR-9*

- Se realizaron 3 rondas de selección por ciclo de adsorción-desorción de acuerdo con protocolos estándar. Brevemente, se aplicó el siguiente método. Se recubrieron placas de 96 pocillos (Nunc) con un péptido sintético que
25 representa parte de la secuencia del receptor 9 tipo toll (TLR-9). Se agregaron 200 μ l por pocillo de la siguiente solución: tampón carbonato Na 0,1M, pH 9,6, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

Primer ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml de péptido TLR-9

- 30 Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 500 μ g/ml de péptido TLR-9

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 100 μ g/ml de péptido TLR-9

- 35 Se realizó la incubación durante 1 hora aproximadamente a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-P133) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

- Después, la biblioteca de fagos de expresión en superficie se dejó reaccionar con el péptido unido por adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45
40 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

- Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue. Después de la primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS; después de la segunda selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10x 300 μ l de PBS; después de la tercera selección por ciclos
45 de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

- La elusión de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se neutralizó la suspensión del fago mediante adición de 60 μ l de base Tris 2M, seguida de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml
50 de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron a 30°C durante la noche.

55

60

65

TABLA 1

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca CH3-fago en el péptido TLR-9 (títulos de fago)

Ronda de selección por adsorción-desorción	Concentración de TRL-9 en por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	1 mg/ml	6×10^{18}	2×10^{10}
2°	0,5 mg/ml	4×10^{18}	2×10^{10}
3°	0,1 mg/ml	4×10^{22}	6×10^{10}

Ejemplo 5

Clonación de clones seleccionados de mutantes CH3 seleccionados contra TLR-9 para expresión soluble

El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica regiones CH3 mutadas se amplificó por lotes por PCR y se clonó NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 µl de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50 µl de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA (ver a continuación).

Ejemplo 6

ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9

Se analizó el enlace específico de los clones seleccionados frente al péptido TLR-9 por ELISA.

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100 µl por pocillo, 20 µg de péptido TLR-9/ml tampón carbonato pH 9,6, 1 h a 37°C

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a temperatura ambiente

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

Enlace de extractos periplásmicos: 50 µl de extracto periplásmico 50 ml de BSA-PBS al 2% a temperatura ambiente durante la noche.

Lavado: 3x 200 µl de PBS

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA- PBS al 1%, 90 min a TA, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

ES 2 320 374 T3

Segundo anticuerpo: cabra antirratón*HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PES al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección: 3 mg/ml de OPD en tampón citrato/fosfato de Na, pH 4,5, 0,4 μ l H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

Los clones que dieron señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describe anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo como se describe anteriormente y se ensayaron con ELISA (como se describe arriba) para confirmación.

TABLA 2

Resultados del ELISA de confirmación

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A 492/620 4 lecturas	A 492/620 1 lectura
A67	0,0435	0,019
B54	0,0937	0,051
C67	0,0295	0,013
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,0115		

Ejemplo 7

Selección por ciclos de adsorción - desorción de la biblioteca de fagos CH3 y CH3+5 en lisozima de huevo de gallina

Se realizaron 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. Se recubrieron placas de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, por adición de 200 μ l de la siguiente solución por pocillo:

PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

ES 2 320 374 T3

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 μ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

TABLA 3

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3 en lisozima de huevo de gallina (títulos de fago)

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml		$4,7 \times 10^{10}$
2°	1 mg/ml	$1,29 \times 10^{22}$	$8,0 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,71 \times 10^{20}$	$4,8 \times 10^{10}$

TABLA 4

Resultados de la selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca de fagos CH3+5 en lisozima de huevo de gallina (HEL) (títulos de fago)

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Concentración de HEL por ciclo de adsorción-desorción	Entrada (fago/ml)	Salida (fago/ml)
1°	2 mg/ml	$8,3 \times 10^{16}$	$2,9 \times 10^9$
2°	1 mg/ml	$2,1 \times 10^{19}$	$2,6 \times 10^9$
3°	1 mg/ml	$5,4 \times 10^{19}$	$1,2 \times 10^{10}$

Ejemplo 8

Clonación de clones seleccionados del ejemplo 7 para expresión soluble

La clonación de clones seleccionados para expresión soluble se realizó como se describe anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9

ES 2 320 374 T3

Ejemplo 9

Expresión soluble de clones seleccionados del ejemplo 7

5 La expresión soluble de clones seleccionados se realizó como se describe anteriormente para los mutantes CH3 seleccionados frente a TLR-9. Los extractos periplásmicos se ensayaron en un ELISA preliminar (protocolo ver ejemplo 10).

10 Los clones que dieron señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describe anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 de volumen de cultivo como se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (como se describe en el ejemplo 10) para confirmación.

15 Ejemplo 10

ELISA de mutantes CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

20 Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorp), 100 μ l por pocillo, 100 μ l de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C.

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

25 Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Enlace de extractos periplásmicos: 50 μ l de extracto periplásmico 50 μ l de BSA-PBS al 2% a temperatura ambiente durante la noche

30 Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

35 Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

40 Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

45 Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

50 TABLA 5

Resultados de ELISA de confirmación de mutantes de CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

	Con antígeno	Sin antígeno
55 Clon	A _{492/620} 4 lecturas	A _{492/620} 1 lectura
60 B12	0,396	0,012
D10	0,415	0,026
65 D46	0,398	0,011
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,1763		

ES 2 320 374 T3

TABLA 6

Resultados de ELISA de confirmación con diluciones de antígeno de mutantes de CH3 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

C (µg/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,55	0,78	0,39
clon										
B12	0,707	0,532	0,432	0,297	0,192	0,150	0,148	0,049	0,034	0,015
D46	0,713	0,561	0,342	0,220	0,133	0,088	0,047	0,032	0,021	0,010
D10	0,415	0,685	0,571	0,368	0,231	0,175	0,171	0,068	0,047	0,026
-(nc)	0,449	0,360	0,165	0,072	0,038	0,023	0,017	0,013	0,009	0,007
Nc: sin extracto periplásmico añadido										

Se observa que la lisozima de huevo de gallina reacciona con anticuerpo anti-his4, por lo tanto se observa un fondo relativamente alto.

TABLA 7

Resultados de ELISA de confirmación de mutantes of CH3+5 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

	Con antígeno	Sin antígeno
Clon	A _{492/620} 4 lecturas	A _{492/620} 1 lectura
A13	0,197	0,016
A66	0,461	0,019
B18	0,533 (5 lecturas)	No realizado
B20	0,184	0,016
B68	0,535	0,019
B40	0,706	0,051
C24	0,352	0,072
D22	0,147	0,019
C22	0,439	0,017
D37	0,360	0,026
D40	0,559	0,034
D56	0,369	0,019
Fondo (el antígeno solo) (12 lecturas en paralelo): 0,1334		
Nota: La lisozima de huevo de gallina reacciona con el anticuerpo anti-his4, por lo tanto se observa un fondo relativamente alto.		

Ejemplo 11

Biblioteca CL

5 La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento de Fab (se emplea la estructura del Fab del anti-cuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) entrada 1DFB.PDB (He XM, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1992 Aug 1;89(15):7154-8) y el análisis asistido por ordenador (por ejemplo, para este propósito se usa Protein Explorer (<http://molvis.sdsc.edu/protexpl/frntdoor.htm>)) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína) permite identificar residuos localizados en regiones del bucle que conectan las hebras beta de la plan-
10 tilla del dominio CL. Estos residuos comprenden los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 y los aminoácidos 123 a 126 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT (Lefranc MP, *et al.* Nucleic Acids Res. 2005 Jan 1; 33 (Database issue):0593-7; Lefranc MP, *et al.* Dev Comp Immunol. 2005; 29(3):185- 203)).

15 Más específicamente, los residuos 11, 12, 14-18, y 92-95 se aleatorizan dentro del dominio CL humano (SEC ID N° 48). La aleatorización se logra por amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en que las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que potencialmente codifica todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones de parada. El inserto de la biblioteca se amplifica mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan en conjunto mediante un sitio restricción
20 HpyCH4IV que se introduce como mutación silenciosa mediante los cebadores PCR. Además, los cebadores proporcionan los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para clonar en el vector de expresión de fago pHEN (Hoogenboom HR, *et al.* Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15):4133-7). La cisteína C-terminal del dominio CL no se incluye para la expresión de fago, pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon CL modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

25 Como una plantilla para la amplificación PCR, se usa un plásmido pRcCMV-3D6LC (Rüker F, *et al.* Ann N Y Acad Sci. 1991 Dec 27; 646:212-9), que contiene como inserto la cadena ligera completa del anticuerpo monoclonal humano.

30 Para las bibliotecas CL+3 (SEC ID N° 50, 51) y CL+5 (SEC ID N° 52, 53), que contienen residuos adicionales insertados entre las posiciones 92 y 95 del dominio CL, se emplean los cebadores CLRHPY3 y CLRHPY5 respectivamente en lugar del cebador CLRHPY.

35 A continuación se muestra (SEC ID N° 48, 49) la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del producto final del PCR las ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que conduce a la unión de una secuencia líder peIB con el extremo N de la construcción:

```

+3   M K Y       L L P T A A A G L L L L A A
40   1   ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

      NcoI
45   +3   Q P A T A V A A P S V F I F P P
      51 CCAGCCGGCC ATGGCCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT
50
      +3   S           Q           A       S V V C   L L N
55   101 CTNNSNNSCA GNNSNNSNNS NNSNNSGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT

      +3   N F Y P R C A   K V Q W K V D N A L
60   151 AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGGAAGGTGG ATAACGCCCT

      +3   Q S G       N S Q E S V T   E Q D       S K D
65   201 CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTACAG AGAGCAGGAC AGCAAGGACA

```

ES 2 320 374 T3

HpyCH4IV

+3 S T Y S L S S T L T L Y E

5 251 GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTACGT TGNNSNNSNN SNNSTACGAG

+3 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P

10 301 AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

NotI

15 +3 V T K S F N R G E A A A

351 CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGGC GGCCGCA

20

Lista de cebadores para la biblioteca CL:

25 cllnco: 5'-cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcattcttc
cgccatctnn snnscagnns nnsnnsnnsn nsgcctctgt tgtgtgc-3' (SEC
ID N° 56)

30

cllhpy: 5'-tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc-31 (SEC ID N° 57)

35

clrhpy: 5'-tcagaacggt gnnnsnnsnns nnstacqaqa
aacacaaagt c-3' (SEC ID N° 58)

40

clrhpy3: 5'-tcagaacggt gnnnsnnsnns nnsnnsnnsn
nstacgagaa acacaaagtc-3' (SEC ID N° 59)

45

clrhpy5: 5'-tcagaacggt gnnsrmsnns nnsnnsnnsn
nstacgagaa aaagtc-3' (SEC ID N° 60)

50

clrnot: 5'-catcgoggcc gcctotcccc tgttgaagct c3' (SEC
ID N° 61)

55

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que los numerosos clones seleccionados de la biblioteca (dominios CL mutados clonados en el vector fagémido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las siguientes etapas de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Después. Las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

65

Ejemplo 12

Biblioteca CH1

5 La inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento Fab (se usa la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: RSCB Protein Data Bank Entry 1DFB.PDB) y el análisis asistido por ordenador (se utiliza Protein Explorer para este propósito) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína permite identificar residuos ubicados en regiones del bucle que conectan las hebras beta del patrón del dominio CH1. Estos residuos comprenden los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117 (numeración de acuerdo con el sistema de numeración IMGT).

Más específicamente, los residuos 12-19 y 93-100 se aleatorizan dentro del dominio CH1 humano (SEC ID N° 54, 55). La aleatorización se logra mediante amplificación PCR de las secuencias de codificación con cebadores PCR en que las posiciones de los codones relevantes se codifican por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que codifica potencialmente todos los 20 aminoácidos, evitando 2 de los 3 codones. El inserto de la biblioteca se amplifica mediante dos reacciones PCR separadas y los dos fragmentos PCR se ligan en conjunto mediante un sitio de restricción BstEII que aparece de forma natural en el dominio CH1. Los cebadores proporcionan además los sitios de restricción de endonucleasa NcoI y NotI respectivamente para la clonación en el vector de expresión del fago pHEN. La cisteína C-terminal del dominio CH1 no se incluye para la expresión del fago pero puede agregarse posteriormente cuando se utiliza un clon CH1 modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

Se usa como plantilla para la amplificación PCR un plásmido como pRcCMV-3D6HC, que contiene como inserto la cadena pesada completa del anticuerpo monoclonal humano.

25 A continuación se muestra (SEC. ID N° 54, 55) la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del producto final de los PCRs y ligaciones, clonada en el sitio NcoI de pHEN1, que lleva a la unión de una secuencia líder pelB con el extremo N de la construcción:

30 +3 M K Y L P T A A A G L L L L A A
1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTOOCGGC

35

NcoI

40 +3 Q P A M A A S T K G P S V F P L
51 CCAGCCGGCC ATGGCCGCCT CCACCAAGGG CCCATCGGTC TTCCCCCTGG

45 +3 A P S S A L G C L
101 CACCCTCCTC CNNSNNSNNS NNSNNSNNSN NSNNSGCCCT GGGCTGCCTG

50

+3 V K D Y F P E P V T V S W N S G A

55 151 GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGDA ACTCAGGCGC

60

65

ES 2 320 374 T3

+3 L T S G V H T F P A V L Q S S G

201 CCTGACCAGC GGCGTGCACA CCTTCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC

5

BstEII

+3 L Y S L S S V V T V P

251 TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCNNSNNSNN SNNSNNSNNS

10

+3 T Y I C N V N H K P S N T K V D

15

301 NNSACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA

NotI

20

+3 K K V E P K S A A A

351 CAAGAAAGTT GAGCCCAAAT CTGCGGCCGC A

25

Lista de cebadores para la biblioteca CH1

CH1LNCO: 5'-acctccatgg ccgcctccac caagggccca

30

tggtcttcc ccctggcacc ctctccnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsn
sgccctgggc tgctg gtc-3' (SEC ID N° 62)

35

CH1LBST: 5'-ggcacggtca ccacgctgct gag-3' (SEC ID N° 63)

40

CHIRBST: 5'-agcgtggtga ccgtgcccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa
cctacatctg caacgtgaat c-3' (SEC ID N° 64)

45

CHIRNOT: 5'-catagcggcc gcagatttgg gctcaacttt cttgtc-
3' (SEC ID N° 65)

50

Mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN se controla que los numerosos clones seleccionados de la biblioteca (dominios CH1 mutados clonados en el vector fagémido pHEN1) contengan el inserto planificado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las siguientes etapas de preparación del fago, se siguen protocolos estándar. Brevemente, la mezcla de ligación se transforma en células TG1 de *E. coli* por electroporación. Posteriormente, se rescatan partículas fago de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Después, Las partículas de fago se precipitan a partir del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se utilizan para la selección por ciclos de adsorción-desorción o, de forma alternativa, se pueden almacenar a menos 80°C.

55

Ejemplo 13

60

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca del fago-CH1 en lisozima de huevo de gallina (HEL)

Se realizan 3 rondas de selección de ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca fago-CH1 (ver ejemplo 12). Placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) se revisten con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200 µl de la siguiente solución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

65

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

ES 2 320 374 T3

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

5 La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 µl por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 µl de suspensión de fago y 100 µl de leche deshidratada al 4% (M-PBS),
10 seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 µl de T-PBS, 5 x 300 µl de PBS.

15 Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 µl de T-PBS, 10 x 300 µl de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 µl de T-PBS, 20 x 300 µl de PBS.

20 La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 µl de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100 µg/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

25

Clonación de clones seleccionados de mutantes CH1 seleccionados frente a lisozima para expresión soluble

30 El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica dominios CH1 mutados se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina,
35 se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 µl de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50 µl de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA.

40 Los clones que dan señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describen anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y ensayan con ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

ELISA de mutantes CH1 seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

Revestimiento: placa de micro titulación (NUNC, Maxisorp), 100 µl por pocillo, 100 µg de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C

50 Lavado: 3 x 200 µl de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

55 Lavado: 3 x 200 µl de PBS

Enlace de extracto periplásmico: 50 µl de extracto periplásmico 50 µl de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

60 Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 µl por pocillo

65

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

ES 2 320 374 T3

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

5 Lectura de absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es al menos tres veces la de la señal de fondo.

10

Ejemplo 14

Selección por ciclos de adsorción-desorción de la biblioteca fago-CL en lisozima de huevo de gallina (HEL)

15 Se realizan 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción con la biblioteca de fago-CL (ver ejemplo 11).

Se revisten placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con lisozima de huevo de gallina, añadiendo 200 μ l de la solución siguiente por pocillo: PBS, con las concentraciones siguientes de lisozima de huevo de gallina:

20 Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 2 mg/ml HEL

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 1 mg/ml HEL

25

La incubación se realizó durante 1 hora a 37°C, seguida de bloqueo con leche deshidratada al 2% (M-PBS) con 200 μ l por pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente.

30

Después, se permite que la biblioteca de fagos de expresión en superficie reaccione con la lisozima de huevo de gallina ligada mediante adición de 100 μ l de suspensión de fago y 100 μ l de leche deshidratada al 4% (M-PBS), seguido de incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fago no ligadas se lavaron por arrastre como sigue:

35

Primera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 10 x 300 μ l de T-PBS, 5 x 300 μ l de PBS.

Segunda ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 15 x 300 μ l de T-PBS, 10 x 300 μ l de PBS.

Tercera ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción: 20 x 300 μ l de T-PBS, 20 x 300 μ l de PBS.

40

La elución de las partículas de fago ligadas se realizó añadiendo 200 μ l por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2 e incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de fago se neutralizó por adición de 60 μ l de Base Tris 2M, seguido de infección en células TG1 de *E. coli* por mezcla de 10 ml de cultivo de crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido e incubación durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, las bacterias infectadas se dispusieron en medio TYE con glucosa al 1% y 100 μ g/ml de ampicilina, y se incubaron a 30°C durante la noche.

45

Clonación de clones seleccionados de mutantes CL seleccionados frente a lisozima para expresión soluble

50

El ADN fagémido del fago seleccionado a través de 3 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción se aísla con un midi-prep. El ADN que codifica dominios CL mutados se amplifica por lotes por PCR y se clona NcoI-NotI en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones ligadas se transformaron en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación y se desarrollaron a 30°C grados en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 μ l de medio 2xYT con ampicilina, se desarrollaron durante la noche a 30°C y se indujeron por adición de L-arabinosa a una concentración final de 0,1%. Después de la expresión a 16°C durante la noche, las células se recolectaron por centrifugación y se trataron con 100 μ l de tampón borato Na, pH 8,0, a 4°C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. 50 μ l de los extractos periplásmicos se emplearon en ELISA.

60

Los clones que dan señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivan en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describen anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aíslan en 1/20 del volumen de cultivo como se describió anteriormente y ensayan con ELISA (como se describe a continuación) para confirmación.

65

ES 2 320 374 T3

ELISA de mutantes CL seleccionados frente a lisozima de huevo de gallina

Revestimiento: placa de micro titulación (NUNC, Maxisorp), 100 μ l por pocillo, 100 μ g de lisozima de huevo de gallina/ml en PBS, 1 h a 37°C

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Bloqueo: BSA-PBS al 1%, 1 h a TA

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Enlace de extracto periplásmico: 50 μ l de extracto periplásmico 50 μ l de BSA-PBS al 2%, a temperatura ambiente durante la noche

Primer anticuerpo: anti-His4 (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA, 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Segundo anticuerpo: cabra anti-ratón*HRP(SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a TA (temperatura ambiente), 100 μ l por pocillo

Lavado: 3 x 200 μ l de PBS

Detección: 3 mg/ml OPD en tampón citrato/fosfato Na, pH 4,5, 0,4 μ l de H₂O₂ al 30%

Parada: 100 ml de H₂SO₄ 3M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

Los clones se interpretan como positivos cuando su señal ELISA es al menos tres veces la de la señal de fondo.

Ejemplo 15

La construcción de un dominio inmunoglobulina que se aleatoriza en ambos lados (dominio CH3 biespecífico de diseño)

Este ejemplo describe un dominio de inmunoglobulina de diseño con dos especificidades de enlace.

El diseño de este dominio de inmunoglobulina de diseño comprende la siguiente estrategia:

* se usa como punto de partida un dominio CH3 de diseño, clon C24 (ver ejemplo 10), derivado de la biblioteca CH3+5 que se une específicamente a lisozima

* los residuos que se tienen que aleatorizar se identificaron en este dominio CH3 modificado, conectando hebras β del pliegue de la inmunoglobulina y disponiéndose en el lado opuesto del dominio comparado con los residuos que se mutaron al generar el clon C24.

* se diseñaron los cebadores PCR que permiten la aleatorización de estos residuos y la síntesis de este dominio de inmunoglobulina de diseño en un procedimiento similar al descrito anteriormente para las bibliotecas CH3, CH3+3 y la CH3+5.

Se ligaron 4 productos PCR que contienen posiciones aleatorizadas y se amplificaron insertos de longitud completa por PCR. Posteriormente, se clonaron en pHEN-1 mediante sitios NcoI-NotI y transformaron en células TG-1 de *E. coli* para construir una biblioteca de aproximadamente 10⁸ colonias. Se secuenciaron 20 colonias seleccionadas aleatoriamente y se encontró que las posiciones aleatorizadas mutaron independientemente. Tampoco se observó la secuencia "salvaje" (C24). La biblioteca del fago se generó siguiendo protocolos estándar, y se logró un título de fago de 6,32 x 10¹⁰ TU/ml.

A fin de probar la biespecificidad, se eligió eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) como segundo antígeno, mientras que se espera que la construcción retenga su especificidad diseñada originalmente para la lisozima de huevo de gallina. El fago reactivo a rhEPO se seleccionó en 4 rondas de selección por ciclos de adsorción-desorción. A fin de conservar la población de clones C24 que después de la mutagénesis todavía se unen a lisozima de huevo de gallina, la primera ronda de selección en rhEPO fue seguida de una ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción de la población fago en lisozima de huevo de gallina (1 mg/ml en PBS). 200 μ l de rhEPO se revistieron en los 5 pocillos de la placa de micro titulación (Maxisorp, Nunc) en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9.6, en concentraciones decrecientes en rondas sucesivas de selección por ciclos de adsorción-desorción (ver tabla siguiente). Después de

ES 2 320 374 T3

bloquear con M-PBS al 2%, se permitió la unión del fago en el agente de bloqueo a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 20 lavados con T-PBS y 20 con PBS, se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,2, y se neutralizó con Tris 2M. El fago eluido se utilizó inmediatamente para infectar TG-1 de crecimiento exponencial. Las células infectadas se seleccionaron en medio que contiene ampicilina. Las partículas de fago se rescataron de sobrenadantes de cultivo hasta superinfección con fago auxiliar M13-KO7, se concentraron con PEG y se utilizaron en otra ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción. Los números de entrada y salida de fago se determinaron como comunidades de transformación de *E. coli* después de cada ronda de selección por ciclos adsorción-desorción (Tabla 8).

TABLA 8

Ronda de selección por ciclos de adsorción-desorción	Antígeno	Entrada de fago (TU/ml)	Salida de fago (TU/ml)
1	rhEPO, 500 µg/ml	$6,32 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$
2	Lisozima, 1 mg/ml	$6,16 \times 10^{15}$	$4,35 \times 10^{10}$
3	rhEPO, 100 µg/ml	$6,07 \times 10^{15}$	$6,78 \times 10^{10}$
4	rhEPO, 100 µg/ml	$8,42 \times 10^{15}$	$3,0 \times 10^{11}$
5	rhEPO, 50 µg/ml	$5,12 \times 10^{15}$	$4,28 \times 10^{10}$

La colonias resultantes se desprendieron de las placas, se cultivaron en 2xYT con ampicilina y su ADN plasmídico se aisló con un midi-prep. Los insertos se amplificaron con PCR y después se subclonaron en el vector pNOTBAD y se transformaron en una cepa E104 de *E. coli*. Se cultivaron 4x72 colonias en 200 µl de 2xYT con ampicilina y Se indujeron con L-arabinosa al 0,1% al día siguiente. Tras 24 h de expresión a 16°C, se rompieron con 200 µl de tampón borato Na, pH 8,0 durante 6 h a 4°C y se usó extracto periplásmico en ELISA.

Para ELISA, se revistieron placas Maxisorp con lisozima de huevo de gallina en PBS (20 µg/ml) o rhEPO en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37°C. Tras el bloqueo con BSA-PBS al 1%, se dejó que el extracto periplásmicos se uniera en el mismo agente de bloqueo durante la noche. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His-(4) y un anticuerpo IgG cabra anti-ratón, conjugado con HRP (para la detección de lisozima de huevo de gallina) o AP (para la detección de rhEPO). El color de la reacción de la conversión OPD (HRP) se leyó a 492/620 nm después de pararse con H₂SO₄ 1,25 M y la conversión pNPP (AP) se leyó a 405/620 nm. 14 clones con valores prometedores de absorbancia se seleccionaron para expresión a escala de 20 ml. Después de 24 h de inducción de arabinosa a 16°C, las células se recogieron y se rompieron durante la noche en 1 ml de tampón borato Na a 4°C, y el lisado se empleó para ELISA. El ELISA se realizó como antes, en 4 paralelos, y se usaron pocillos sin extracto periplásmico y sin antígenos como controles negativos. Los resultados (Tabla 9) se obtuvieron con clones de acuerdo con SEC ID N° 42, 43.

TABLA 9

antígeno		Absorbancia de enlace	Sin extracto periplásmico	Sin antígeno
Lisozima	A _{492/620nm}	0,299	0,110	0,018
rhEPO	A _{405/620nm}	0,258	0,095	0,090

Ejemplo 16

Los dominios CH3 de diseño proporcionan biespecificidad en un formato tipo Fab

En la construcción empleada en este ejemplo, tanto la cadena VL como la cadena VH de un anticuerpo se fusionan en un dominio CH3 de diseño.

La región VL y VH del anticuerpo monoclonal humano 3D6. (He XM, *et al.* Pro Natl Acad Sci USA. 1992 89:7154-8., Kohl J. *et al.* Ann N Y Acad Sci. 1991 646:106-14., Felgenlauer M, *et al.* Nucleic Acids Res. 1990 18:4927), que reconocen un epítipo en gp41 de HIV-1 se utilizaron como socio de fusión para el clon C24 del dominio CH3 diseñado que se une específicamente a lisozima de huevo de gallina.

A fin de promover la formación del dímero VL-CH3/VH-CH3 mediante un enlace disulfuro, se añadieron los residuos Ser-Cys al extremo C de las secuencia C24.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos respectivamente de las dos cadenas 3D6VL-C24 y 3D6VH-C24 se indican en SEC ID N° 47, 46 y SEC ID N° 45, 44, respectivamente.

Se diseñaron cebadores que permiten la amplificación de las regiones de codificación, introduciendo al mismo tiempo sitios de restricción (mutaciones silenciosas) que se emplearon para reunir las regiones de codificación. Para la expresión de los genes, se escogió el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se clonaron construcciones en vectores de expresión apropiados de *Pichia pastoris*: 3D6VL-C24 se clonó en pPIC9K (nombre final: pPIC9K3LC) y 3D6VH-C24 (nombre final: pPICZ3HC) se clonó en pPICZalphaA. La construcción pPICZ3HC se linealizó con Bgl II, se transformó en *Pichia pastoris* GS115 y los transformantes se seleccionaron en medio sólido que contiene zeocina. Uno de los transformantes se usó posteriormente como célula huésped para la construcción linealizada pPIC9K3LC. Después se seleccionaron dobles transformantes en medio RDB.

Los clones se inocularon en 30 ml de medio YPG y se desarrollaron hasta OD₆₀₀=10, y después se indujeron por adición de metanol al 1% en medio BMMY. La inducción se continuó durante 36 horas a 16°C. Se retiraron los sobrenadantes por centrifugación y después se concentraron aproximadamente 10 veces. La presencia de la proteína recombinante se confirmó por transferencia Western con un anticuerpo anti-His (4) y se estimó una concentración de aproximadamente 50-100 µg/l de cultivo inicial.

Las primeras pruebas funcionales se realizaron con sobrenadante 10x concentrado. Primero, los pocillos de las placas Maxisorp se revistieron con 20 µg/ml de lisozima de huevo de gallina en PBS o 20 µg/ml de epítipo del anticuerpo 3D6 en tampón carbonato Na 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37°C. El epítipo 3D6 se utilizó en forma de una proteína de fusión GST producida por recombinación. Después de bloquear con BSA-PBS al 1%, se dejó que los sobrenadantes concentrados se unieran durante la noche en el mismo agente bloqueante. El enlace se reveló con un anticuerpo anti-His(4) y anticuerpo cabra anti-ratón, conjugado con HRP, y se visualizó como reacción de color resultante de la conversión OPD a 492/620 nm (Tabla 10).

TABLA 10

antígeno	Señal ELISA (A _{492/620})	Fondo (sin antígeno)	Fondo (sin sobrenadante)
Lisozima	0,198	0,003	0,043
3D6	0,061	0,001	0,007

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dominio constante de inmunoglobulina o parte del mismo de origen humano, que comprende al menos una región del bucle estructural de cualquiera de los dominios CH1, CH2, CH3, CH4 o CL, comprendiendo al menos una región del bucle estructural al menos una modificación que permite el enlace de al menos dicha región del bucle estructural a un epítipo de un antígeno, en que el dominio constante de la inmunoglobulina modificada no se une a dicho epítipo, excluyendo dicha modificación la incorporación de un péptido farmacológicamente activo de 2 a 40 aminoácidos en el dominio Fc.
- 10 2. Una inmunoglobulina modificada según la reivindicación 1, en que dicha región modificada del bucle es cualquiera de los dominios C κ o C λ .
- 15 3. Una inmunoglobulina modificada según la reivindicación 1 o 2, en que dicha región modificada del bucle es cualquier fragmento Fab.
4. Una inmunoglobulina modificada según la reivindicación 1, en que dicha región modificada del bucle es cualquier fragmento Fc.
- 20 5. Una inmunoglobulina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que deriva de IgG.
6. Una inmunoglobulina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con al menos dos regiones modificadas del bucle estructural.
- 25 7. Inmunoglobulina que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en que dicha región modificada del bucle estructural comprende al menos 6 modificaciones de aminoácidos.
- 30 8. Molécula que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos otra molécula de unión, en que esta otra molécula de unión mencionada se selecciona del grupo de inmunoglobulinas modificadas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, receptores solubles, ligandos, ácidos nucleicos y carbohidratos.
- 35 9. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque cualquiera de las regiones modificadas del bucle estructural de un CH1, CH2, CH3 o CH4 comprenden una modificación en una de las posiciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 o los aminoácidos 106 a 117, donde la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la de IMGT.
- 40 10. Molécula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque cualquiera de las regiones de C κ o C λ comprende una modificación en una de las posiciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 8 a 18, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117 o los aminoácidos 123 a 126, donde la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la de IMGT.
- 45 11. Ácidos nucleico que codifica una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

50

55

60

65

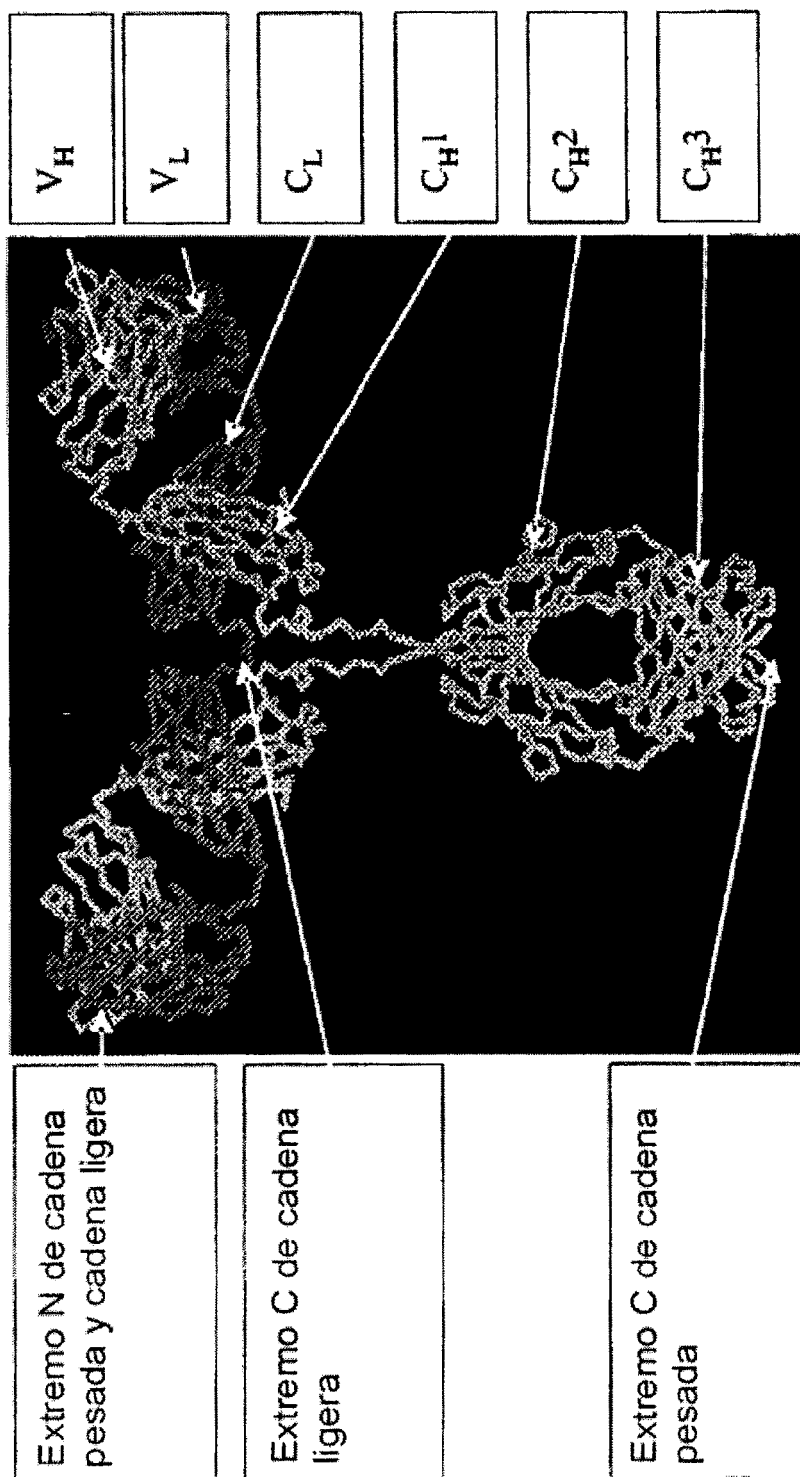


Fig. 1a

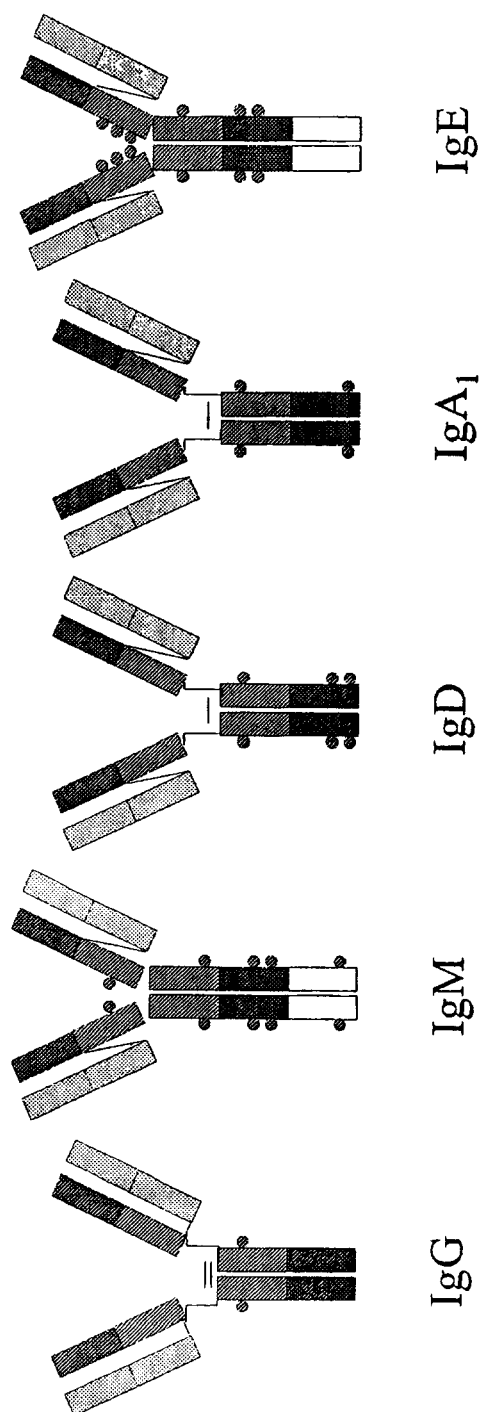


Fig. 1b

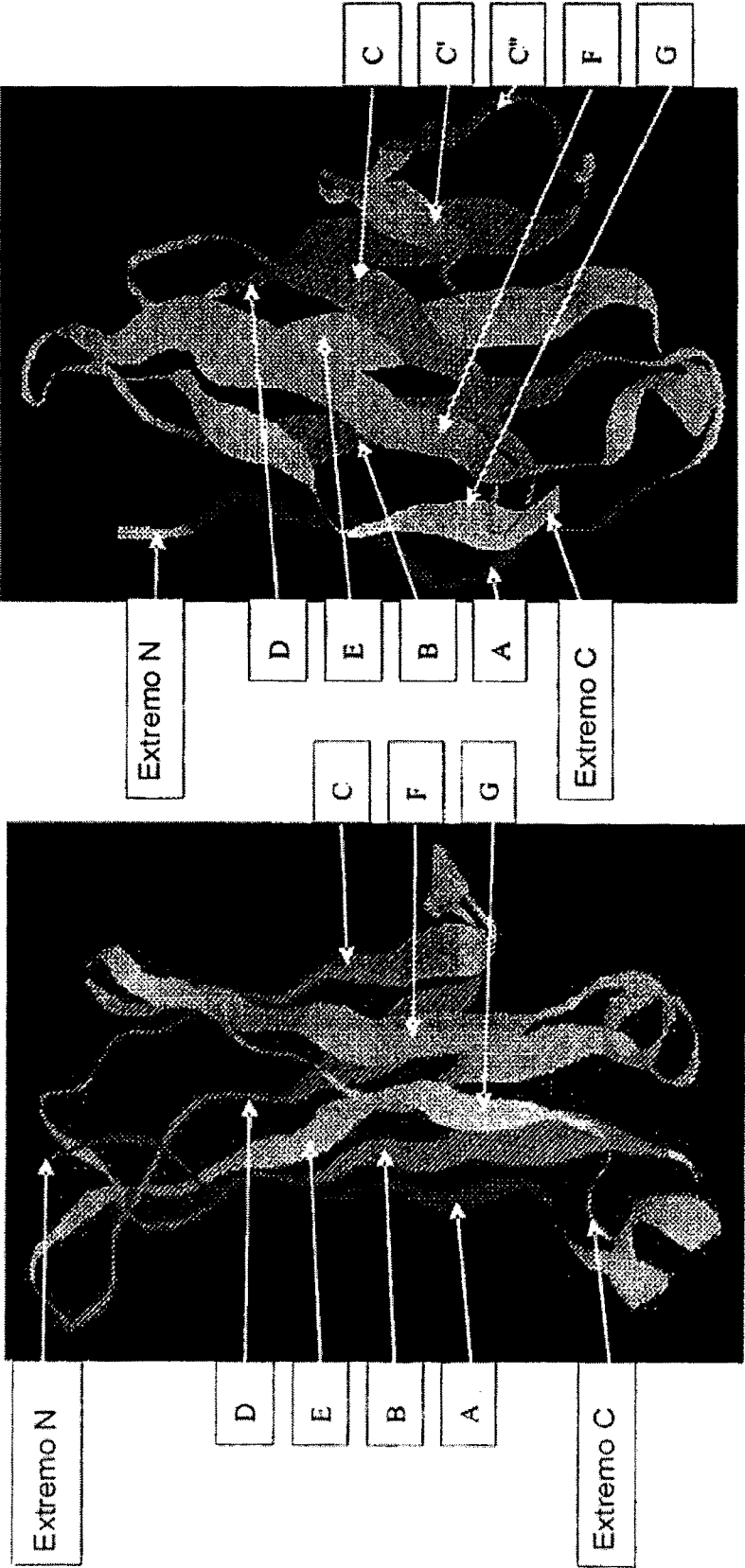


Fig. 2

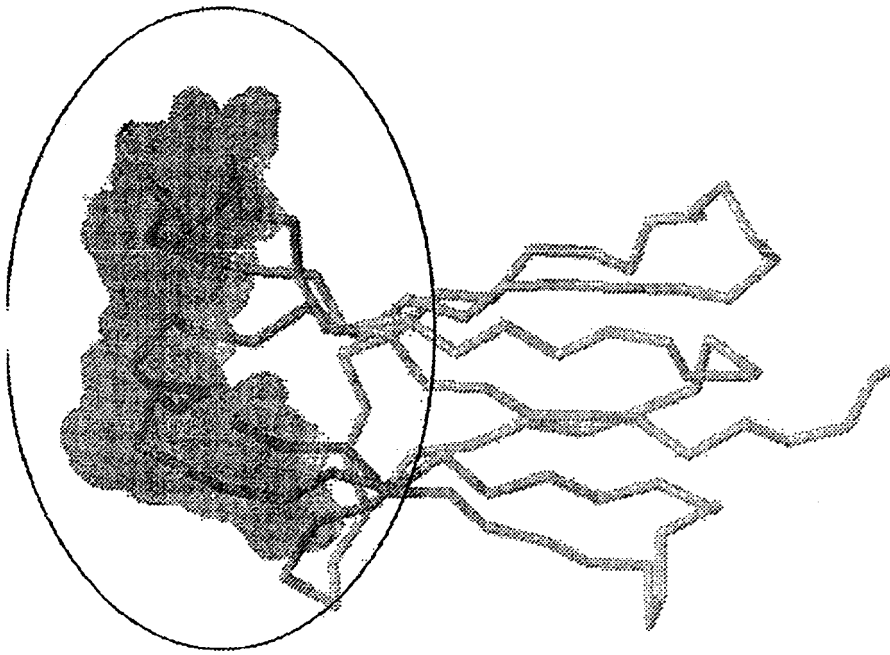


Fig. 3

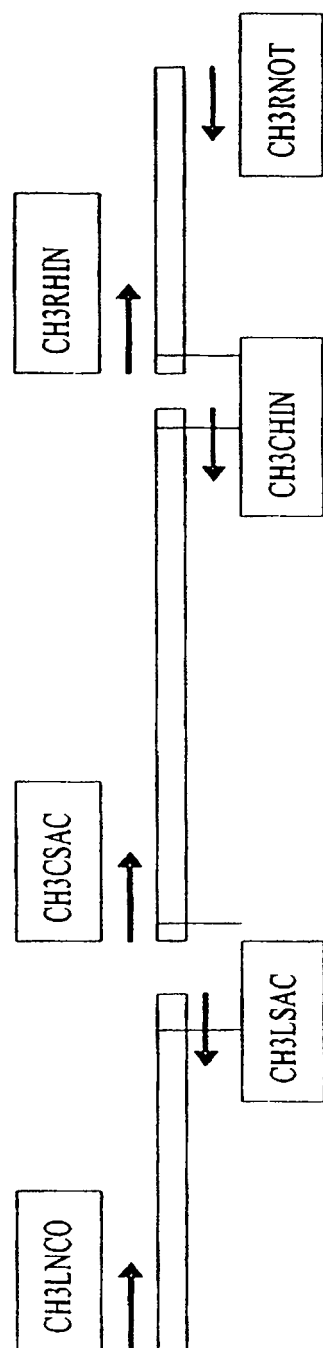


Fig. 4

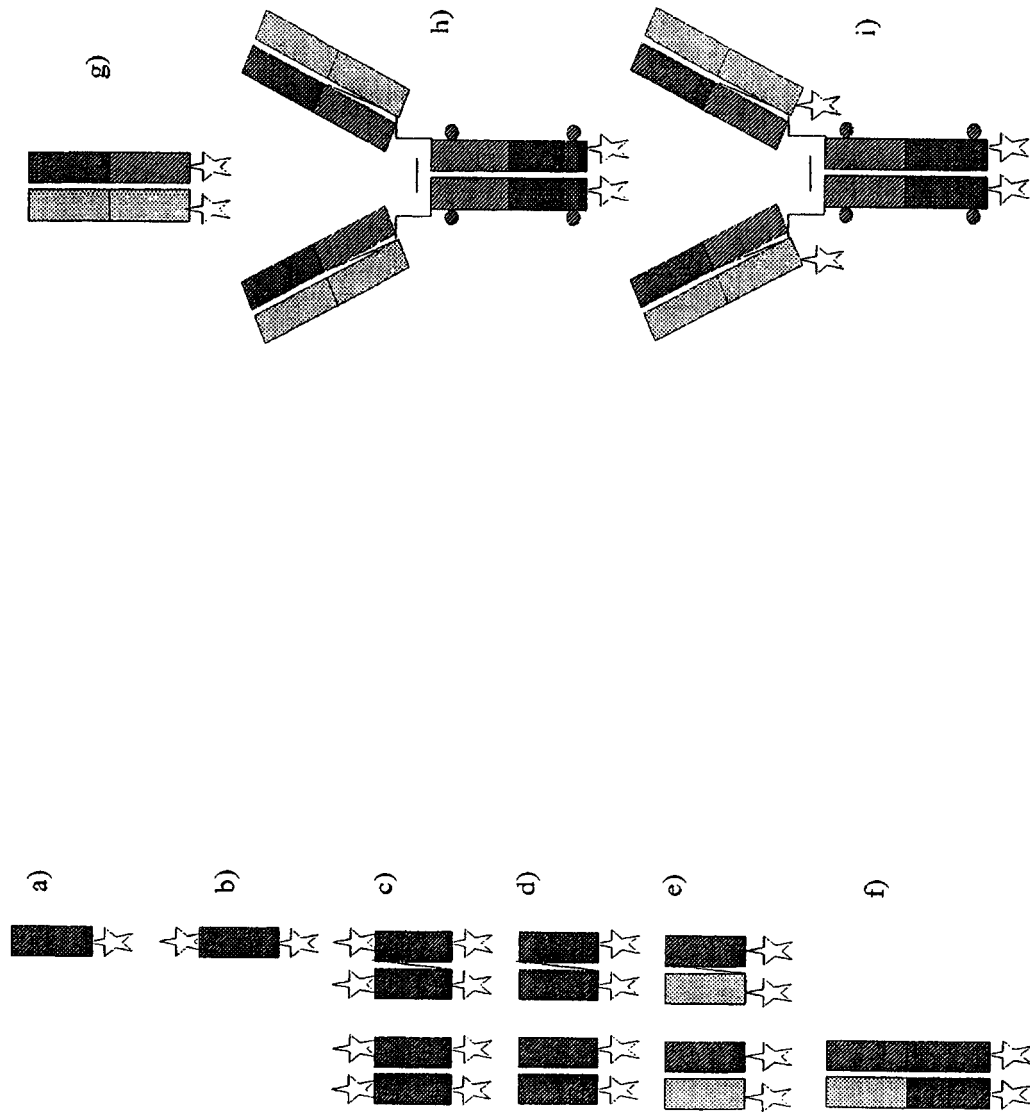


Fig. 5

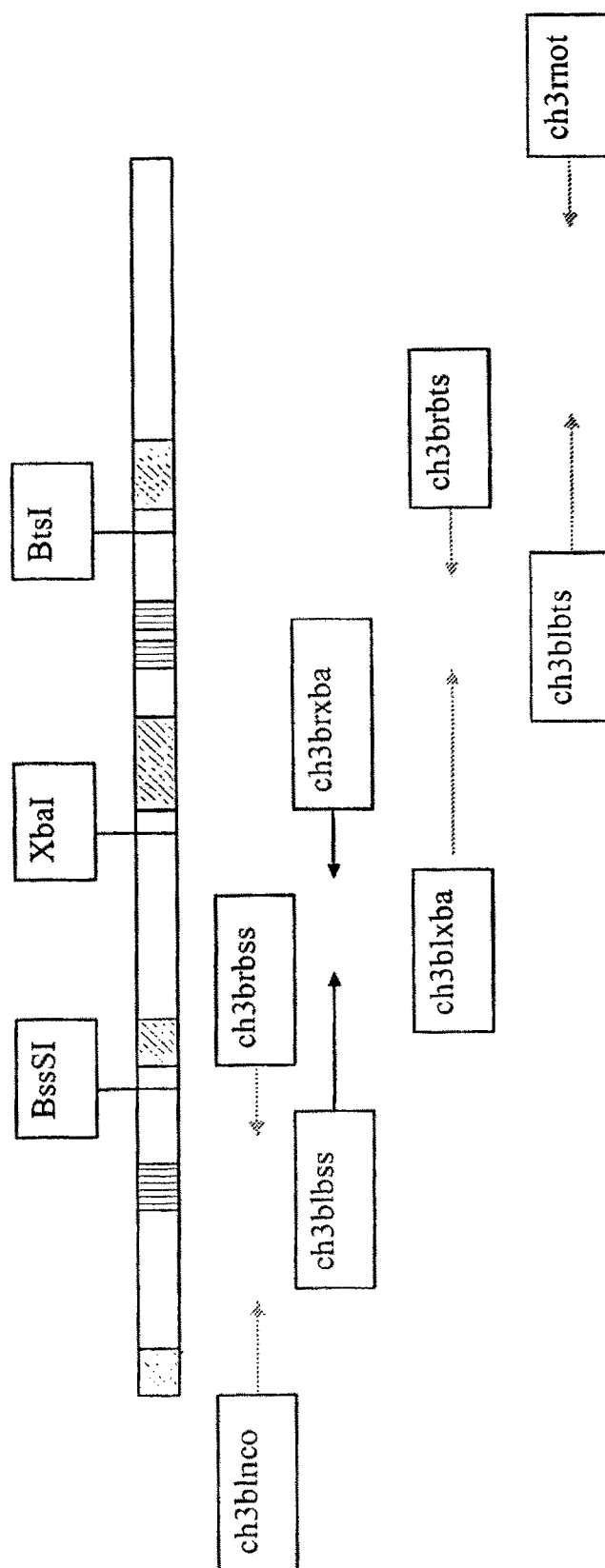


Fig. 6

+3 R E P Q V Y T L P P S R D E L Q V S L T C L V K G F
 1 NRSCGAGAAC CACAGGTGTA CACCTGCCC CCATCCCGTG ACGAGCTCNN SNNNSNSCAA GTCAGCTGA CTGCCTGT AAAAGGCTTC NNSNNSNSN
 NNSGCTCTTG GTGTCCACAT GTGGGACGGG GGTAGGGCAC GTCTCGAGNN SNNNSNSGTT CAGTCGACT GGACGGAGCA CTTCCGAAG NNSNNSNSN

 +3 I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
 101 NRATCGCCGT GGAGTGGGAG AGCAATGGG AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCCTC CCGTCTGA CTCCGACGGC NNSNNSNSN NSNSTCCTT
 NSTAGCGGCA CCTCACCCCTC TCGTTACCCG TCGGCCCTCTT GTTGATGTTT TGGTGGGAG GGCAAGATCT GAGGCTGCCG NNSNNSNSN NSNNSAGGAA

 +3 F L Y S K L T V R W G N V F S C S V M L H N H Y T
 201 CTTCCTCTAC AGCAAGCTTA CCGTGNNSNN SNNAGGTGG NNSNSGGGA ACGTCTCTC ATCCATGTG ATGNNNSNSN NSCTGCACAA CCACTACACA
 GAAGGAGATG TCGTTCGAAT GGCACNNSNN SNNSTCCACC NNSNSCCCT TGCAGAAGAG TACGTACAC TACNNNSNSN NSGACGTGTT GGTGATGTGT

 +3 Q K S L S L S P G K A A A
 301 CAGAAGAGCC TCCTCCTGTC TCCGGGTAAA CGGGCCGCA
 GTCTTCTCGG AGAGGGACAG AGGCCCATTT CGCCGGCGT

Fig. 7

ES 2 320 374 T3

Fig 8.

SEC ID N° 1: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del anticuerpo loqo.pdb

1 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
31 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
61 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEAL
91 HNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEC ID N° 2: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 de diseño del Ejemplo 1

1 CCATGGCCCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTCNSN
NSNNSCAGGT
71 CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG
CAATGGGCAG
141 CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTTCCTCCTC
TACAGCAAGC
211 TTACCGTGNN SNNSNNSAGG TGGNNSNNSG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG
AGGCTCTGCA
281 CAACCACTAC ACACAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAAGCGGCCG CA

SEC ID N° 3: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de diseño del Ejemplo 1

1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
61 DGSFFLYSKLTVXXXRWXXGNVFSQSV MHE
91 ALHNH YTQKSLSLSPGKAAA

SEC ID N° 4: Cebador PCR de CH3LNCO

cttgccatgg ccccccgaga accacaggtg tac

SEC ID N° 5: Cebador PCR de CH3LSAC

agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg

SEC ID N° 6: Cebador PCR de CH3CSAC

ES 2 320 374 T3

gtacgagctc nnsnnsnnc aagtcagccl gacctgcctg g

SEC ID N° 7: Cebador PCR de CH3RHIN

tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg

SEC ID N° 8: Cebador PCR de CH3RHIN

tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsaggtg gnnsnnsagg aacgtctct catgctccg

SEC ID N° 9: Cebador PCR de CH3RNOT

agtgcggcc gcttaccgc gagacagga gag

SEC ID N° 10: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3+3 de diseño

**1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSCSV
91 MHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA**

SEC ID N° 11: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3+3 de diseño

**1 ccatggtccc ccgagaacca cagggtgaca cctgcccc atccgtgac gagctcnsn
61 nsnnscaagt cagcctgacc tgccgggtca aaggcttcta tcccagcgac atgcccgtgg
121 agtgggagag caatgggcag ccgagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact
181 ccgacggctc cttctccctc tacagcaagc ttaccgtggn snnsnnsnns nnsnnsaggt
241 ggnsnnsagg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca
301 cacagaagag cctctccctg tctccgggta aagcgccgc a**

SEC ID N° 12: Cebador PCR CH3RHIN3

**1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsnnsn snnsaggtgg nnsnnsagg aacgtctctc
61 atgctccg**

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 13: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3+5 de diseño

1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXRWXXGNVFSC
91 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEC ID N° 14: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3+5 de diseño

1 ccatggcccc ccgagaacca cagggtgaca ccctgcccc atcccgtag gagctcnnsn
61 nsnnscaagt cagcctgacc lgcctggta aaggcttcla tccagcgac atcgccgtgg
121 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgcggact
181 ccgacggctc ctctctctc tacagcaagc ttaccgtggn snnsnnsnns nnsnnsnnsn
241 nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc
301 actacacaca gaagagctc tccctgtctc cgggtaaagc ggccgca

SEC ID N° 15: Cebador PCR CH3RHIN5

1 tgccaagctt accgtgnnsn nshnsnnsnn snnsnnsnns aggtggnnsn nsgggaacgt
61 ctctcatgc tccg

SEC ID N° 16: Secuencia de aminoácidos del clon D07 anti-EpCAM

PREPQVYTLPPSRDEL**GW****PQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS****DGSFFLYSKL**
TVPKRWCVSYRWPP**GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEC ID N° 17: Secuencia de nucleótidos del clon D07 anti-EpCAM

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCTGGCCGCAAGTCA
GCCTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCCCAAGCGGTGGTGCGTGAGCGTCAGGTGGCCCCCGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 18: Secuencia de aminoácidos del clon C67 anti-EpCAM

PREPQVYTLPPSRDELSVQVSPTCLVKGFYP6DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVIPFCRMSPRWWMGNVFSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 19: Secuencia de nucleótidos del clon C67 anti-EpCAM

CCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTCGGTGTCGCAAGTCA
GCCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCAGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGATCCCCTTCTGCAGGATGAGCCCCAGGTGGTGGATCGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAA

SEC ID N° 20: Secuencia de aminoácidos del clon D64C3 anti-fluoresceína

PREPQVYTLPPSRDELEALQVSLTCLVKGFYP6DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VRRNRWSVWGNVFSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 21: Secuencia de nucleótidos del clon D64C3 anti-fluoresceína

CCTCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGAGGCGCTGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCGGCGCAACAGGTGGTCCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 22: Secuencia de aminoácidos del clon A68 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELQGSQVSLTCLVKGFYP6DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVKSRATRRWWVGNVFSCSVMH~~EA~~LHNHYTQKNLSLSPGK

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 23: Secuencia de nucleótidos del clon A68 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCAGGGGAGCCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT

ACAGCAAGCTTACCGTGAAGTCGCGCGCCACCCGGAGGTGGGTGGTGGGGAACGTCTTTTCTTG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAACCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA

SEC ID N° 24: Secuencia de aminoácidos del clon B23 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELAIGQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
VRSTRDNRWLVGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEC ID N° 25: Secuencia de nucleótidos del clon B23 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGCGATCGGCCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCGCTCGACGAGGGACAACAGGTGGCTGGTGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA

SEC ID N° 26: Secuencia de aminoácidos del clon B40 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELSGAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TWFERQEGGMRWFAGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 27: Secuencia de nucleótidos del clon B40 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCAGCGGGGCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTGGTTCAGGCAGGAGGGCGGCATGAGGTGGTTCGCGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEC ID N° 28: Secuencia de aminoácidos del clon C24 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYGKL
TVPPRLKGWPRWGWNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 29: Secuencia de nucleótidos del clon C24 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA
GCCCCACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCT
ACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEC ID N° 30: Secuencia de aminoácidos del clon D46 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELLYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VVAGRWTCGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 31: Secuencia de nucleótidos del clon D46 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCTGGCGTACCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGGTGGCCGGCAGGTGGACGTGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 32: Secuencia de aminoácidos del clon D56 anti-lisozima

PREPQVYTLPPSRDELCVPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVLKWVQARRWEVGNVFSCSVMHEAALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 26: Secuencia de nucleótidos del clon D56 anti-lisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTGCGTCCCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT

ACAGCAAGCTTACCGTGGTGTCAAGGTCGTGCAGGCGCGCAGGTGGGAGGTGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEC ID N° 34: Secuencia de aminoácidos del clon A23 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VLGRRWILGNVFSCSVMH~~EA~~ALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 34: Secuencia de nucleótidos del clon A23 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 36: Secuencia de aminoácidos del clon A23 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VLGRRWILGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 37: Secuencia de nucleótidos del clon A23 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA
GCTTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
GCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 38: Secuencia de aminoácidos del clon D2 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELLPCQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VECPRWLGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 39: Secuencia de nucleótidos del clon D2 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTTGCCCTGCCAAGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTTACCGTGTTCTGCCCCAGGTGGCTGGGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 40: Secuencia de aminoácidos del clon D68 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELTKNQVS~~LT~~CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TP~~PPVLDSDGSFFLYSKLT
VPCMRWYWG~~GN~~VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 41: Secuencia de nucleótidos del clon D68 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAAC~~TACA~~AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCCCTGCATGAGGTGGTGGGGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

SEC ID N° 42: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3
bienespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima
y a eritropoyetina, clon D72

RREPQVYTLPPSRDELVLGQVSLACLVKGFVRLIAVEWESNGQPENNYK~~TP~~PPVLDSDGRQLAD~~SFF~~
LYSKLTVPPRLKGWPRWG~~WGN~~VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 43: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3
bienespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima
y a eritropoyetina, clon D72

CGGCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA
GCCTGGCCTGCCTCGTGAAAGGCTTCGTGGTCCGGTTGATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAAC~~TACA~~AAGACCACGCCTCCCGTTCTAGACTCCGACGGCCGGCAGTTGGCG
GACTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGG
GCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCAGTGTGATGTTCTGGCGCTGCACAACCACTACACACAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

SEC ID N° 44: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VH-C24)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSSSIGYADSVKG
RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDMALYYCVKGRDYDSSGGYFTVAFDIWGQGTMTVSSASTKGPQ
VYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYGKLTVPPPRL
KGWPRWGWGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 45: Secuencia de nucleótidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VH-C24)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG
GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATAAGTTGGGATAGTAGTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAA
GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGCTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGA
GAGCTGAGGACATGGCCTTATATTACTGTGTAAAAGGCAGAGATTACTATGATAGTGGTGGTTATT
TCACGGTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAG
GGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC
GGAGAACAÁACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACGGCA
AGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACIACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 46: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VL-C24)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITTCRASQSISRWLAWYQKPGKVPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDFAFYCCQYNSYSFSGPGTKVDIKRTVAEPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYGKLTVPRLKGWPRWGWGNVFCSSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 47: Secuencia de aminoácidos de la construcción tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-HIV1-gp41 y el clon C24 anti-lisozima (3D6-VL-C24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCC
TAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGG
ATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTG
CCAACAGTATAATAGTTATTCTTTGCGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAAGTGTGGCTGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACGGCAAG
CTTACCGTGCCCCCGCGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA

SEC ID N° 48: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CL

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLLXXXYE
101 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEAAA

SEC ID N° 49: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT

201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNSTACGAG
301 AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC
351 CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGGCGGCCGCA

SEC ID N° 50: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca
CL+3

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSXXXXXX
101 XYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

SEC ID N° 51: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca
CL+3

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT
351 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGGCGGCCGCA

SEC ID N° 52: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca
CL+5

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSXXXXXX
101 XXXYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

ES 2 320 374 T3

SEC ID N° 53: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CL+5

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT

201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS
351 GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCG
401 CA

SEC ID N° 54: Secuencia de aminoácidos de la biblioteca CH

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAASTKGPSVFPLAPSSXXXXXXXXXALGCL
51 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPXXXXXX
101 XTYICNVNHHKPSNTKVDDKKVEPKSAAA

SEC ID N° 55: Secuencia de nucleótidos de la biblioteca CH

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
101 CACCCTCCTCCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGCTGCTGCTG
151 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGC
201 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
251 TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCNNSNNSNNSNNSNNSNNS
301 NNSACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
351 CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGCGGCCGCA

ES 2 320 374 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rüker, Florian

<120> DOMINIOS DE INMUNOGLOBULINA SINTÉTICA CON PROPIEDADES DE ENLACE MODIFICADAS EN REGIONES DE LA MOLÉCULA DIFERENTES DE LAS REGIONES DE DETERMINACIÓN DE COMPLEMENTARIEDAD

<130> R 46751

<140> EP 06703578.2

<141> 2006-01-05

<150> US 60/641144

<151> 2005-01-05

<160> 65

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 332

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 320 374 T3

<221> característica_misc
 <222> (57)..(58)
 <223> n es a, c, g, o t
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (60)..(61)
 10 <223> n es a, a, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (63)..(64)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (219)..(220)
 <223> n es a, c, g, ar t
 25
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (222)..(223)
 30 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 35 <222> (225)..(226)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 40 <222> (234)..(235)
 <223> n es a, c, g, o t
 45
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (237)..(238)
 50 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 2

 55 ccat ggcgcc ccgagaacca caggt gt aca ccct gccccc at cccgggat gagct cnnsn 60
 nsnnscaggt cagcct gacc tgcct ggt ca aaggct t cl a tcccagcgac at cgccgt gg 120
 agt gggagag caat gggcag ccggagaaca act acaagac cagcct ccc gt gct ggact 180
 60 ccgacggct c ct t cl t cct c t acagcaagc t t accgt gnn snnsnnsagg t ggnsnns 240
 ggaacgt ct t ct cat gct cc gt gal gcat g aggct ct gca caaccact ac acacagaaga 300
 gcct ct ccct gt ct ccgggt aaagcggccg ca 332
 65

 <210> 3

ES 2 320 374 T3

<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Secuencia Artificial

10 <220>

<221> característica_misc
<222> (19)..(21)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
<221> característica_misc
<222> (73)..(75)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
<221> característica_misc
<222> (78)..(79)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

30 <400> 3

Met Ala Pro Arg Gu Pro G n Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

35

Gu Leu Xaa Xaa Xaa G n Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

40

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gu Trp Gu Ser Asn Gly G n Pro Gu
35 40 45

45

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

50

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Xaa Xaa Xaa Arg Trp Xaa Xaa Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Gu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

55

Thr G n Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Ala Ala
100 105 110

60 <210> 4

<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

65

<220>
<223> Secuencia Artificial

ES 2 320 374 T3

	<400> 4	
	ct t gccat gg ccccccgaga accacaggt g t ac	33
5	<210> 5	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia Artificial	
15	<400> 5	
	agt cgagct c gt cacgggat gggggcaggg	30
20	<210> 6	
	<211> 41	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (11)..(12)	
35	<223> n es a, c g, o t	
	<220>	
40	<221> característica_misc	
	<222> (14)..(15)	
	<223> n es a, c, g, o t	
45	<220>	
	<221> característica_misc	
	<222> (17)..(18)	
	<223> n es a, c, g, o t	
50	<400> 6	
	gt acgagct c nnsnnsnsc aagt cagcct gacct gcct g g	41
55	<210> 7	
	<211> 32	
	<212> ADN	
60	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 320 374 T3

<400> 7

tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg

32

5 <210> 8
 <211> 59
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (17)..(18)
 20 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (32)..(33)
 40 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 8

50 t gccaaagct t accgt gnnsn nsnsaggt g gnnsnnsagg aacgtctt ct cat gct ccg

59

<210> 9
 55 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 9

65 agttgcggcc gctttaccg gagacaggga gag

33

ES 2 320 374 T3

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19)..(21)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (73)..(78)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (81)..(82)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30
 <400> 10

 Met Ala Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 35
 Glu Leu Xaa Xaa Xaa Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 40
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 50
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Trp
 65 70 75 80
 55
 Xaa Xaa Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 85 90 95
 60
 55
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Ala
 100 105 110
 60
 Ala
 <210> 11
 <211> 341
 <212> DNA
 65 <213> Artificial

ES 2 320 374 T3

<220>

<223> Secuencia Artificial

5 <220>

<221> característica_misc

<222> (57)..(58)

<223> n es a, c, g, o t

10

<220>

<221> característica_misc

<222> (60)..(61)

15

<223> n es a, c, g, o t

<220>

20

<221> característica_misc

<222> (63)..(64)

<223> n es a, c, g, o t

25

<220>

<221> característica_misc

<222> (219)..(220)

<223> n es a, c, g, o t

30

<220>

<221> característica_misc

<222> (222)..(223)

35

<223> n es a, c, g, o t

<220>

40

<221> característica_misc

<222> (225)..(226)

<223> n es a, c, g, o t

45

<220>

<221> característica_misc

<222> (228)..(229)

<223> n es a, c, g, o t

50

<220>

<221> característica_misc

<222> (231)..(232)

55

<223> n es a, c, g, o t

<220>

60

<221> característica_misc

<222> (234)..(235)

<223> n es a, c, g, o t

65

<220>

<221> característica_misc

<222> (243)..(244)

ES 2 320 374 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5 <221> característica_misc
<222> (246)..(247)
<223> n es a, c, g, o t

10 <400> 11

	ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca cccggcccc alcccgtagac gagctcnnsn	60
	nnsnnscaagt cagcccgacc tgcctgggtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg	120
15	agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagccctccc gtgctggact	180
	ccgacggctc ctctctcctc tacagcaagc ttaccgtggn ssnnsnns nnsnnsaggt	240
	ggnsnnsagg gaacgtcttc tcatgctccg tgalgcatga ggctctgcac aaccactaca	300
20	cacagaagag cctctccctg tctccgggt a aagcggccgc a	341

<210> 12

<211> 68

25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>

30 <223> Secuencia Artificial

<220>

<221> característica_misc

35 <222> (17)..(18)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

40 <221> característica_misc
<222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, o t

45 <220>

<221> característica_misc
<222> (23)..(24)

50 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

55 <222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, o t

<220>

60 <221> característica_misc
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g, o t

65 <220>

<221> característica_misc

ES 2 320 374 T3

<222> (32)..(33)

<223> n a, c, g, o t

5 <220>

<221> característica_misc

<222> (41)..(42)

<223> n es a, c, g, o t

10

<220>

<221> característica_misc

<222> (44)..(45)

15

<223> n es a, c, g, o t

<400> 12

20

t gccaaagct t accgt gnnsn nsnnnsnn snnaggt gg nnsnsggga acgt cttctc 60

at gct ccg 68

25

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

35

<220>

<221> característica_misc

<222> (19)..(21)

40

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> característica_misc

45

<222> (73)..(80)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50

<220>

<221> característica_misc

<222> (83)..(84)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

55

60

65

ES 2 320 374 T3

<400> 13

5 Met Ala Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1 5 10 15

Glu Leu Xaa Xaa Xaa Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
20 25 30

10 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

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

20 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80

Arg Trp Xaa Xaa Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
85 90 95

25 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105 110

30 Ala Ala Ala
115

<210> 14

<211> 347

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (57)..(58)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (60)..(61)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (63)..(64)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (219)..(220)

<223> n e s a, c, g, o t

ES 2 320 374 T3

<220>
<221> característica_misc
<222> (222)..(223)
5 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
10 <222> (225)..(226)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
15 <221> característica_misc
<222> (228)..(229)
<223> n es a, c, g, o t

20 <220>
<221> característica_misc
<222> (231)..(232)
25 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
30 <222> (234)..(235)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
35 <221> característica_misc
<222> (237)..(238)
<223> n es a, c, g, o t

40 <220>
<221> característica_misc
<222> (240)..(241)
45 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
<222> (249)..(250)
50 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
55 <222> (252)..(253)
<223> n es a, c, g, o t

60

65

ES 2 320 374 T3

<400> 14	
	ccat ggcgcc cgcgagaacca cagggtgtaca ccccgcccc atcccgtgac gagctcnnsn 60
5	nsnnscaagt cagcctgacc tgcctggcca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg 120
	agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact 180
	ccgacggctc ctcttctc t acagcaagc ttaccgtggn snnnsnnsnns nnsnnsnnsn 240
10	nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc 300
	actacacaca gaagagcctc tccctgtctc cgggt aaagc ggccgca 347
15	<210> 15
	<211> 74
	<212> ADN
	<213> Artificial
20	<220>
	<223> Secuencia Artificial
25	<220>
	<221> característica_misc
	<222> (17)..(18)
	<223> n es a, c, g, o t
30	<220>
	<221> característica_misc
	<222> (20)..(21)
35	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
40	<221> característica_misc
	<222> (23)..(24)
	<223> n es a, c, g, o t
45	<220>
	<221> característica_misc
	<222> (26)..(27)
	<223> n es a, c, g, o t
50	<220>
	<221> característica_misc
	<222> (29)..(30)
55	<223> n es a, c, g, o t
	<220>
60	<221> característica_misc
	<222> (32)..(33)
	<223> n es a, c, g, o t
65	<220>
	<221> característica_misc
	<222> (35)..(36)

ES 2 320 374 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5 <221> característica_misc

<222> (38)..(39)

<223> n es a, c, g, o t

10 <220>

<221> característica_misc

<222> (47)..(48)

15 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

20 <222> (50)..(51)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 15

25 **tgccaaagctt accgtgnnsn nsnnnsnnnn snnnsnnns aggtggnnsn nsgggaacgt 60**

cttctcatgc tccg 74

30 <210> 16

<211> 110

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

40 <400> 16

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15

45 **Gly Trp Pro Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro**
20 25 30

50 **Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn**
35 40 45

55 **Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu**
50 55 60

60 **Tyr Ser Lys Leu Thr Val Pro Lys Arg Trp Oys Val Ser Val Arg Trp**
65 70 75 80

Pro Pro Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
85 90 95

65 **Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys**
100 105 110

ES 2 320 374 T3

<210> 17
 <211> 330
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10
 <400> 17

 ccccgagaac cacagggtgt a caccctgcc ccatcccggtg acgagctcgg ctggccgcaa 60
 15 gt cagcctaa cctgcctgg taaaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tcttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg cccaagcggg ggtgcgtgag cgtcagggtgg 240
 20 cccccgggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

 <210> 18
 25 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia Artificial

 35 <400> 18

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 1 5 10 15

 Ser Val Ser Gln Val Ser Pro Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 20 25 30

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 35 40 45

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

 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ile Pro Phe Cys Arg Met Ser Pro Arg Trp
 65 70 75 80
 55
 Trp Ile Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 85 90 95

 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105 110

 <210> 19
 <211> 330
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 320 374 T3

<220>

<223> Secuencia Artificial

5 <400> 19

	ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccatcccggtg acgagctct c ggtgtcgcaa	60
	gtcagcccga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcgg acatcgcagt ggagtgggag	120
10	agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	180
	tcttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg atcccttct gcaggatgag cccaggtgg	240
	tggatcggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca	300
15	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	330

<210> 20

<211> 105

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia Artificial

<400> 20

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

<210> 21

<211> 315

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 21

```

5      cctcgagaac cacaggt gl a caccct gccc ccat cccgl g acgagct cga ggcgct gcaa      60
      gtcagcct ga cct gcct ggt caaaggct t c t at cccagcg acat cgccgt ggagi gggag      120
      agcaal gggc agccggagaa caact acaag accacgcc t c ccgl gct gga ct cggacggc      180
10     t cct t c t t cc t ct acagcaa gct t accgl g cggcgcaaca ggt ggt cct g ggggaacgt c      240
      t t ct cal gct ccgt gat gca t gaggct ct g cacaaccact acacacagaa gacgt ct cc      300
      ct gl ct ccgg gl aaa . 315

```

15 <210> 22

<211> 108

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25 <400> 22

```

30     Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
      1          5          10          15

      Gln Gly Ser Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      20          25          30

35     Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      35          40          45

40     Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      50          55          60

      Tyr Ser Lys Leu Thr Val Lys Ser Arg Ala Thr Arg Arg Trp Val Val
      65          70          75          80

45     Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      85          90          95

50     Tyr Thr Gln Lys Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100          105

```

<210> 23

55 <211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 23

```

ccccgagaac cacaggt gl a caccct gcc ccacccgt g acgagct cca ggggagccaa      60
5  gl cagcct ga cct gcc t ggt caaaggct t c t at cccagcg acat cgccgt ggagt gggag      120
agcaat gggc agccggagaa caact acaag accacgcc t c ccgt gct gga ct ccgacggc      180
10 t cct t c t t c c t c t acagcaa gct t accgt g aag t cgcgcg ccacccggag gt ggg t ggt g      240
gggaacgt ct t t t c t t gct c cgt gat gcat gaggct ct gc acaaccact a cacacagaag      300
aacct ct ccc t gt ct ccggg t aaa      324

```

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25

<400> 24

```

30 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
   1           5           10           15

Ala Ile Gly Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
   20           25           30

35 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
   35           40           45

40 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
   50           55           60

45 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Arg Ser Thr Arg Asp Asn Arg Trp Leu Val
   65           70           75           80

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
   85           90           95

50 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
   100           105

```

<210> 25

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

60

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 25

5 ccccgagaac cacaggt gta caccct gcc ccat cccgt g acgagct cgc gat cggccaa 60
 gtcagcct ga cctgcct ggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 10
 tcttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg cgcctgacga gggacaacag gtggctggtg 240
 15 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 300
 agcctctccc tgtctccggg taaa 324

<210> 26

20 <211> 110

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 26

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

<210> 27

<211> 330

60 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

65 <223> Secuencia Artificial

ES 2 320 374 T3

<400> 27

5 ccccgagaac cacaggt g t a caccct gcc cccat cccgt g acgagct cag cggggcgcaa 60
gt cagcct ga cct gcc t ggt caaaggct t c t at cccagcg acal cgccgt ggagt gggag 120
agcaat gggc agccggagaa caact acaag accacgcct c ccgt gct gga ct ccgacggc 180
t cct t ct t cc t ct acagcaa gct t accgt g t ggt t caggc aggagggcgg cal gaggt gg 240
10 t t cgcgggga acgt ct t ct c at gct ccgt g at gcat gagg ct ct gcacaa ccact acaca 300
cagaagagcc t ct ccc t g t c t ccgggt aaa 330

15 <210> 28

<211> 110

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25 <400> 28

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

<210> 29

55 <211> 330

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 29

```

5      ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccatcccg g acgagctcgt ct tggggcaa      60
      gt cagccccga cclgcctggg caaaggcttc t atcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      120
      agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc      180
10     t ccttcttcc tctacggcaa gcttaccgtg cccccgggt tgaagggtg gccgaggtgg      240
      ggctggggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca      300
      cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      330

```

15 <210> 30

<211> 105

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25

<400> 30

```

30     Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
      1          5          10          15

35     Leu Ala Tyr Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      20          25          30

40     Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      35          40          45

45     Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      50          55          60

50     Tyr Ser Lys Leu Thr Val Val Ala Gly Arg Trp Thr Cys Gly Asn Val
      65          70          75          80

55     Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
      85          90          95

      Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100          105

```

55 <210> 31

<211> 315

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 31

```

ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccatcccggtg acgagctcc tggcgt accaa    60
5  gt cagcctga cctgcctgg t caaaggttc t atcccagcg acatcgccgt ggagtgggag    120
   agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgccctc ccgtgctgga ctccgacggc    180
   tccctcttcc tctacagcaa gcttaccgtg gtggccggca ggtggacgtg cgggaacgtc    240
10  ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc    300
   ctgtctccgg gtaaa                                315

```

15 <210> 32

<211> 110

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25 <400> 32

```

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1      5      10      15
30  Oys Val Pro Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      20      25      30
35  Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      35      40      45
40  Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      50      55      60
45  Tyr Ser Lys Leu Thr Val Val Leu Lys Val Val Gln Ala Arg Arg Trp
      65      70      75      80
   Glu Val Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      85      90      95
50  Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100      105      110

```

55 <210> 33

<211> 330

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 33

```

5      ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccatcccg g acgagctct g cgtcccga 60
      gt cagcct ga cctgcct ggt caaaggcttc t atccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
      agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcct c ccgtgctgga ctccgacggc 180
10     tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg gtgctcaagg t cgtgcaggc gcgcagggtgg 240
      gaggtgggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
      cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

```

15 <210> 34

<211> 105

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25 <400> 34

```

30     Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
      1      5      10
      Gly Ile Ala Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      20      25      30
35     Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      35      40      45
40     Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      50      55      60
45     Tyr Ser Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Arg Trp Thr Leu Gly Asn Val
      65      70      75      80
      Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
      85      90      95
50
      Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100      105

```

55 <210> 35

<211> 315

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 35

```

5      ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccacccggg acgagctcgg catcgcgcaa      60
      gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc t atcccagcg acatcgccgt ggagtgggag      120
      agcaacgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc      180
10     tctttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ttgggcccga ggtggaccct ggggaacgtc      240
      ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gaggctctcc      300
      ctgtctccgg gt aaa                                     315

```

15

<210> 36

<211> 105

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25

<400> 36

```

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

```

55 <210> 37

<211> 315

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 37

```

5      ccccgagaac cacagggtga caccctgcc ccatcccg g acgagctcgg catcgcgcaa    60
      gtcagcttga cctgccctgg caaaggcttt tatcccagc acatcgccgt ggagtgggag    120
      agcaacgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc    180
10     tcttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ttgggcgca ggtggacct ggggaacgtc    240
      ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc    300
      ctgtctccgg gtaaa    315

```

15 <210> 38

<211> 105

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25 <400> 38

```

30     Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
      1      5      10
      Leu Pro Cys Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
      20      25      30
35     Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
      35      40      45
40     Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
      50      55      60
45     Tyr Ser Lys Leu Thr Val Phe Cys Pro Arg Trp Leu Gly Gly Asn Val
      65      70      75      80
      Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
      85      90      95
50     Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      100      105

```

55 <210> 39

<211> 315

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<225> Secuencia Artificial

65

ES 2 320 374 T3

<400> 39

5 ccccgagaac cacagggtgta caccctgcc ccatcccgtagcgagctctt gccctgccaa 60
 gt cagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 10 tctttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg tctgccccca ggtggctggg ggggaacgtc 240
 tctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gacgctctcc 300
 15 ctgtctccgg gt aaa 315

<210> 40

20 <211> 105

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia Artificial

<400> 40

30 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 1 5 10 15
 35 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 20 25 30
 40 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 35 40 45
 45 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 50 55 60
 50 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Pro Oys Met Arg Trp Trp Gly Gly Asn Val
 65 70 75 80
 55 Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 85 90 95
 60 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 100 105

<210> 41

<211> 315

60 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

65 <223> Secuencia Artificial

ES 2 320 374 T3

<400> 41

5 ccccgagaac cacaggtgt a caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 60
gtcagcctga cctgcctggc caaaggcttc t atcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
10 tcttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ccctgcatga ggtggtgggg cgggaacgtc 240
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gacgctctcc 300
ctgtctccgg gt aaa 315

15

<210> 42

<211> 115

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

25

<400> 42

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

60 <210> 43

<211> 345

<212> ADN

<213> Artificial

65

<220>

<223> Secuencia Artificial

ES 2 320 374 T3

<400> 43

```

cggcgagaac cacaggt gta caccctgcc ccacccgtg acgagctcgt ctggggcaa 60
gtcagcctgg cctgcctcgt gaaaggttc ggggtccgt tgalcgccgt ggagtgagg 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgttctaga ctccgacggc 180
cggcagttgg cggactcctt ctctctctac agcaagctta ccgtgcccc gcggttgaag 240
ggctggccga ggtgggctg ggggaacgtc ttctcagca ggtgatgtt cctggcgtg 300
cacaaccact acacacagaa gacgtctcc ctgtctcggg gtaaa 345

```

<210> 44

<211> 238

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia Artificial

<400> 44

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg 1
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Oys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr 20
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35
35 40 45
Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val 50
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr 65
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Leu Tyr Tyr Oys 85
85 90 95
Val Lys Gly Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala 100
100 105 110
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser 115
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 130
130 135 140
Val Leu Gly Gln Val Ser Pro Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 145
145 150 155 160
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 165
165 170 175
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 180
180 185 190
Tyr Gly Lys Leu Thr Val Pro Pro Arg Leu Lys Gly Trp Pro Arg Trp 195
195 200 205
Gly Trp Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 210
210 215 220
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 225
225 230 235

```

ES 2 320 374 T3

<210> 45
 <211> 714
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10
 <400> 45

 15 gaagt gcagc t ggt ggagt c t gggggaggc t t ggt acagc ct ggcaggc c cct gagact c 60
 t cct gt gcag cct ct ggal t cacct t t aat gat t at gcca t gcact gggc ccggcaagct 120
 ccaggggaagg gcct ggagt g ggt ct caggt at aagt t ggg at agt agt ag t at aggct at 180
 20 gcggact ct g t gaagggccg at t caccat c t ccagagaca acgccaagaa ct cct gt at 240
 ct gcaaat ga acagt ct gag agct gaggac at ggcct t at at t act gt gt aaaaggcaga 300
 gat t act at g at agt ggt gg t t al t t cagc gt t gct t t g at at ct gggg ccaagggaca 360
 25 at ggt caccg t ct ct t cagc ct ccaccaag ggcccacagg t gt acacct gcccccac cc 420
 cgt gacgagc t cgt ct t ggg gcaagt cagc ccgacct gcc t ggt caaagg ct t ct at ccc 480
 30 agcgacat cg ccgt ggagt g ggagagcaat gggcagccgg agaacaact a caagaccacg 540
 cct cccgt gc t ggact ccga cggct cct t c t t cct ct acg gcaagct t ac cgt gcccccg 600
 cgg t t gaagg gct ggccgag gt ggggct gg ggggaacgt ct t ct cat gct c cgt gal gcal 660
 35 gaggct ct gc acaaccact a cacacagaag agcct ct ccc t gt ct ccggg t aaa 714

 <210> 46
 40 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia Artificial

 50

 55

 60

 65

ES 2 320 374 T3

<400> 46

5	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
10	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Trp
				20					25					30		
15	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
20	Tyr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
25	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
30	Asp	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Ser	Phe
					85					90					95	
35	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Glu	Pro	Gln
				100					105					110		
40	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Val	Leu	Gly	Gln	Val
			115					120					125			
45	Ser	Pro	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val
		130					135					140				
50	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro
	145					150				155						160
55	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr
					165					170					175	
60	Val	Pro	Pro	Arg	Leu	Lys	Gly	Trp	Pro	Arg	Trp	Gly	Trp	Gly	Asn	Val
				180					185					190		
65	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
			195					200					205			
70	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		210					215									

<210> 47

<211> 651

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 320 374 T3

<223> Secuencia Artificial

<400> 47

5	gacat ccaga t gacccagt c t cct t ccacc ct gt ct gcat ct gl aggaga cagagt cacc	60
	at cact t gcc gggccagt ca gagt at t agt aggt ggt t gg cct ggt at ca gcagaaacca	120
10	gggaaagt cc ct aagct cct gat ct at aag gcat ct agt t t agaaagt gg ggt cccat ca	180
	aggt t cagcg gcagt ggt c t gggacagaa t t cact ct ca ccat cagcag cct gcagcct	240
	gat gat t t t g caact t at t a ct gccaacag t at aat agt t at t ct t t cgg ccct gggacc	300
15	aaagt ggt a t caaacgaac t gt ggct gaa ccacaggt gt acaccct gcc cccat cccgt	360
	gacgagct cg t ct t ggggca agt cagcccg acct gcct gg t caaaggct t ct at cccagc	420
20	gacat cgccg t ggagt ggga gagcaat ggg cagccggaga acaact acaa gaccacgcct	480
	cccg t gct gg act ccgacgg ct cct t ct t c ct ct acggca agct t accgt gccccgcgg	540
	t t gaagggct gggcgaggt g gggct ggggg aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag	600
25	gct ct gcaca accact acac acagaagagc ct ct ccct gt ct ccgggt aa a	651

<210> 48

<211> 129

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia Artificial

<220>

40 <221> característica_misc

<222> (35)..(36)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>

<221> característica_misc

<222> (38)..(42)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50

<220>

<221> característica_misc

<222> (95)..(98)

55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

60

65

ES 2 320 374 T3

<400> 48

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

Ala

<210> 49

<211> 387

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (103)..(104)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (106)..(107)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (112)..(113)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (115)..(116)

ES 2 320 374 T3

<223> n es a, c, g, o t
 <220>
 5 <221> característica_misc
 <222> (118)..(119)
 <223> n es a, c, g, o t
 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (121)..(122)
 <223> n es a, c, g, o t
 15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (124)..(125)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 25 <221> característica_misc
 <222> (283)..(284)
 <223> n es a, c, g, o t
 30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (286)..(287)
 <223> n es a, c, g, o t
 35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (289)..(290)
 40 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 45 <221> característica_misc
 <222> (292)..(293)
 <223> n es a, c, g, o t
 50 <400> 49
 at gaaat acc t at t gcct ac ggcagccgct ggal t gt t at t act cgcggc ccagccggcc 60
 at ggccgt gg ct gcacat c t gt ct t cat c t t cccgccat ct nnsnnsca gnnsnnsnns 120
 55 nnsnnsccct ct gt t gl gt g cct gct gaat aact t ct at c ccagagaggc caaagt acag 180
 t ggaagggt gg al aacgccct ccaat cgggt aact cccagg agagt gt cac agagcaggac 240
 agcaaggaca gcacct acag cct cagcagc accct gacgt t gnnsnnsnn snnst acgag 300
 60 aaacacaaag t ct acgcct g cgaagt cacc cat cagggcc t gagct cgcc cgt cacaaag 360
 agct t caaca ggggagaggc ggccgca 387
 65 <210> 50
 <211> 132
 <212> PRT

ES 2 320 374 T3

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia Artificial

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (35).. (36)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

15 <221> característica_misc

<222> (38)..(42)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20 <220>

<221> característica_misc

<222> (95)..(101)

25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 50

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

<210> 51

<211> 396

<212> ADN

65 <213> Artificial

<220>

ES 2 320 374 T3

<223> Secuencia Artificial

<220>

5 <221> característica_misc
<222> (103)..(104)
<223> n es a, c, g, o t

10 <220>
<221> característica_misc
<222> (106)..(107)
<223> n es a, c, g, o t

15 <220>
<221> característica_misc
<222> (112)..(113)
<223> n es a, c, g, o t

20 <220>
<221> característica_misc
<222> (115)..(116)
<223> n es a, c, g, o t

25 <220>
<221> característica_misc
<222> (118)..(119)
<223> n es a, c, g, o t

30 <220>
<221> característica_misc
<222> (121)..(122)
<223> n es a, c, g, o t

35 <220>
<221> característica_misc
<222> (124)..(125)
<223> n es a, c, g, o t

40 <220>
<221> característica_misc
<222> (283)..(284)
<223> n es a, c, g, o t

45 <220>
<221> característica_misc
<222> (286)..(287)
<223> n es a, c, g, o t

50 <220>
<221> característica_misc
<222> (289)..(290)
<223> n es a, c, g, o t

55 <220>
<221> característica_misc
<222> (289)..(290)
<223> n es a, c, g, o t

60 <220>
<221> característica_misc
<222> (289)..(290)
<223> n es a, c, g, o t

65 <220>
<221> característica_misc
<222> (289)..(290)
<223> n es a, c, g, o t

ES 2 320 374 T3

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (292)..(293)
 5 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (295)..(296)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 15 <221> característica_misc
 <222> (298)..(299)
 <223> n es a, c, g, o t

 20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (301)..(302)
 25 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 51

 30 at gaaat acc t at t gcct ac ggcagccgct ggat t gt t at t act cgcggc ccagccggcc 60
 at ggccgt gg ct gcaccat c t gt ct t cat c t t cccgccat ct nnsnnsca gnnsnnsnns 120
 nnsnnsccct ct gt t gt gt g cct gct gaat aact t ct at c ccagagaggc caaagt acag 180
 35 t ggaagggt gg at aacgccct ccaat cgggt aact cccagg agagt gt cac agagcaggac 240
 agcaaggaca gcacct acag cct cagcagc accct gacgt t gnnsnnsnn snnsnnsnns 300
 nnst acgaga aacacaaagt ct acgcct gc gaagt cacc c al cagggcct gagct cgccc 360

 40
 gt cacaaaga gct t caacag gggagaggcg gccgca 396

 <210> 52
 45 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia Artificial

 <220>
 55 <221> característica_misc
 <222> (35)..(36)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (38)..(42)
 65 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>

ES 2 320 374 T3

<221> característica_misc

<222> (95)..(103)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5

<400> 52

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1      5      10
Ala Gln Pro Ala Met Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
20      25
Pro Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ser Val Val Oys Leu
35      40      45
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Gu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
50      55      60
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Gu Ser Val Thr Gu Gln Asp
65      70      75      80
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Xaa Xaa
85      90      95
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Gu Lys His Lys Val Tyr Ala Oys
100      105      110
Gu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
115      120      125
Arg Gly Gu Ala Ala Ala
130

```

40

<210> 53

<211> 402

<212> ADN

45

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

50

<220>

<221> característica_misc

55

<222> (103)..(104)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

60

<221> característica_misc

<222> (106)..(107)

<223> n e s a, c, g, o t

65

<220>

<221> característica_misc

<222> (112)..(113)

ES 2 320 374 T3

<223> n es a, c, g, o t

<220>

5 <221> característica_misc

<222> (115)..(116)

<223> n es a, c, g, o t

10 <220>

<221> característica_misc

<222> (118)..(119)

15 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

20 <222> (121)..(122)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

25 <221> característica_misc

<222> (124)..(125)

<223> n es a, c, g, o t

30 <220>

<221> característica_misc

<222> (283)..(284)

35 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

40 <222> (286)..(287)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

45 <221> característica_misc

<222> (289)..(290)

<223> n es a, c, g, o t

50 <220>

<221> característica_misc

<222> (292)..(293)

55 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

60 <222> (295)..(296)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

65 <221> característica_misc

<222> (298)..(299)

<223> n es a, c, g, o t

ES 2 320 374 T3

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (301)..(302)
 5 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (304)..(305)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 15 <221> característica_misc
 <222> (307)..(308)
 <223> n es a, c, g, o t

 20 <400> 53

 25 at gaaat acc t at t gcct ac ggcagccgct ggal t gt t at t act cgcggc ccagccggcc 60
 at ggccgt gg ct gcaccat c t gt ct t cal c t t cccgccat ct nnsnnsca gnnsnnsnns 120
 nnsnnsgcc t ct gt t gt gt g cct gct gaat aact t ct at c ccagagaggc caaagt acag 180
 t ggaagg gt gg at aacgccct ccaat cgggt aact cccagg agagt gt cac agagcaggac 240
 30 agcaaggaca gcacct acag cct cagcagc accct gacgt t gnnsnnsnn snnsnnsnns 300
 nnsnnsnns t acgagaaaca caaagt ct ac gcct gcgaag t cacccat ca gggcct gagg 360
 t cgcccgct ca caaagagct t caacagggga gaggcggccg ca 402
 35

 <210> 54
 <211> 127
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> característica_misc
 50 <222> (38)..(45)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 55 <221> característica_misc
 <222> (95)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 60

 65

ES 2 320 374 T3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 381

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial

<220>

<221> característica_misc

<222> (112)..(113)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (115)..(116)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (118)..(119)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

<222> (121)..(122)

<223> n e s a, c, g, o t

<220>

ES 2 320 374 T3

<221> característica_misc
<222> (124)..(125)
<223> n es a, c, g, o t
5
<220>
<221> característica_misc
<222> (127)..(128)
10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
15 <222> (130)..(131)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
20 <221> característica_misc
<222> (133)..(134)
<223> n es a, c, g, o t
25
<220>
<221> característica_misc
<222> (283)..(284)
30 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
35 <222> (286)..(287)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
40 <221> característica_misc
<222> (289)..(290)
<223> n es a, c, g, o t
45
<220>
<221> característica_misc
<222> (292)..(293)
50 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> característica_misc
55 <222> (295)..(296)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
60 <221> característica_misc
<222> (298)..(299)
<223> n es a, c, g, o t
65
<220>
<221> característica_misc

ES 2 320 374 T3

<222> (301)..(302)

<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 55

at gaaat acc t at t gcct ac ggcagccgct ggal t gt t at t act cgcggc ccagccggcc 60

at ggccgcct ccaccaaggg cccat cggc t t cccct gg caccct cct c cnnsnnsnns 120

10 nnsnnsnnsn nsnsgccct gggct gcct g gt caaggact act t cccga accggt gacg 180

gt gt cgt gga act caggcgc cct gaccagc ggcgt gcaca cct t cccggc t gt cct acag 240

t cct caggac t ct act ccct cagcagcgt g gt gaccgt gc ccnsnnsn snnsnnsnns 300

15 nnsacct aca t ct gcaacgt gaat cacaag cccagcaaca ccaaggt gga caagaaagt t 360

gagcccaaat ct gcggccgc a 381

20 <210> 56

<211> 87

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia Artificial

30 <220>

<221> característica_misc

<222> (49)..(50)

<223> n es a, c, g, o t

35

<220>

<221> característica_misc

<222> (52)..(53)

40

<223> n es a, c, g, o t

<220>

45 <221> característica_misc

<222> (56)..(59)

<223> n es a, c, g, o t

50 <220>

<221> característica_misc

<222> (61)..(62)

<223> n es a, c, g, o t

55

<220>

<221> característica_misc

<222> (64)..(65)

60

<223> n es a, c, g, o t

<220>

65 <221> característica_misc

<222> (67)..(68)

<223> n es a, c, g, o t

ES 2 320 374 T3

	<220>		
	<221> característica_misc		
	<222> (70)..(71)		
5	<223> n es a, c, g, o t		
	<400> 56		
10	ct t acca t gg ccgt ggct gc acca t ct gt c t t ca t ct t cc cgccat ct nn s n n s c a g n n s	60	
	n n s n n s n n s n n s g c c t ct gt t gt gt gc	87	
	<210> 57		
	<211> 26		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia Artificial		
	<400> 57		
25	tgacaacgtc aggg t gct gc t gaggc		26
	<210> 58		
	<211> 41		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Secuencia Artificial		
	<220>		
40	<221> característica_misc		
	<222> (12)..(13)		
	<223> n es a, c, g, o t		
45	<220>		
	<221> característica_misc		
	<222> (15)..(16)		
50	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
	<221> característica_misc		
55	<222> (18)..(19)		
	<223> n es a, c, g, o t		
	<220>		
60	<221> característica_misc		
	<222> (21)..(22)		
	<223> n es a, c, g, o t		
65	<400> 58		
	tcagaacgtt gnnsnnsnns nnst acgaga aacacaaagt c		

ES 2 320 374 T3

<210> 59
 <211> 50
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(13)
 15 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (15)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t
 30
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(22)
 35 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 40 <222> (24)..(25)
 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t
 50
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (30)..(31)
 55 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 59

 60 t cagaacgt t gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nst acgagaa acacaaagt c

 <210> 60
 <211> 56
 65 <212> ADN
 <213> Artificial

50

ES 2 320 374 T3

<220>
 <223> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(13)
 <223> n es a, c, g, o t
 10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (15)..(16)
 15 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 20 <221> característica_misc
 <222> (18)..(19)
 <223> n es a, c, g, o t
 25 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (21)..(22)
 <223> n es a, c, g, o t
 30 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (24)..(25)
 35 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 40 <221> característica_misc
 <222> (27)..(28)
 <223> n es a, c, g, o t
 45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (30)..(31)
 <223> n es a, c, g, o t
 50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (33)..(34)
 55 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 60 <221> característica_misc
 <222> (36)..(37)
 <223> n es a, c, g, o t
 65 <400> 60

tcagaacgtt t gnnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsta cgagaaacac aaagt c

56

ES 2 320 374 T3

<210> 61
 <211> 31
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10
 <400> 61

 cat cgcggcc gcct ct cccc t gt tgaagct c
 15
 <210> 62
 <211> 99
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (58)..(59)
 30 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 35 <221> característica_misc
 <222> (61)..(62)
 <223> n es a, c, g, o t

 40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (64)..(65)
 <223> n es a, c, g, o t
 45
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (67)..(68)
 50 <223> n es a, c, g, o t

 <220>
 55 <221> característica_misc
 <222> (70)..(71)
 <223> n es a, c, g, o t

 60 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (73)..(74)
 <223> n es a, c, g, o t
 65
 <220>
 <221> característica_misc

31

ES 2 320 374 T3

<222> (76)..(77)
 <223> n es a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (79)..(80)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <400> 62
 acgt ccat gg ccgcct ccac caagggccca t cgggt ct t cc ccct ggcacc ct cct ccnns 60
 15 nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn sgccct gggc t gcct ggt c 99

<210> 63
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Secuencia Artificial

<400> 63
 30 ggcacgggt ca ccacgct gct gag 23

<210> 64
 <211> 61
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (19)..(20)
 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 50 <221> característica_misc
 <222> (22)..(23)
 <223> n es a, c, g, o t

55 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25)..(26)
 60 <223> n es a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misc
 65 <222> (28)..(29)
 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 320 374 T3

 $\langle 220 \rangle$

<221> característica misc

<222> (31)..(32)

5 <223> n e s a, c, g, o t

 $\langle 220 \rangle$

<221> característica_misc

10 $\langle 222 \rangle$ (34)..(35)

<223> n e s a, c, g, o t

 $\langle 220 \rangle$

15 <221> característica_misc

<222> (37)..(38)

<223> n e s a, c, g, o t

20 <400> 64

agcgt ggt ga ccgt gccnn snnsnnsns nnsnnsnsa cct acal ct g caacgt gaat 60

C 61

25

<210> 65

<211> 36

<212> ADN

30 <213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia Artificial

<400> 65

cat agcggcc gcagatttgg gctcaactt cttgtc c

36

45

50

55

60

65