

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 885**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2016** **E 18199457 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023** **EP 3447075**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral**

30 Prioridad:

15.05.2015 US 201562162449 P

07.01.2016 US 201662276073 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2024

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)

55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US

72 Inventor/es:

FAUSTMAN, DENISE L.

74 Agente/Representante:

MORENO NOGALES, Ángeles

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 962 885 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral

5 Campo de la invención

La invención se refiere a polipéptidos, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que pueden antagonizar miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, tales como el receptor 2 del factor de necrosis tumoral. Los polipéptidos de la invención se pueden usar para modular la actividad de los linfocitos T reguladores, tal como en el campo de la inmunoterapia para el tratamiento de trastornos de proliferación celular y enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la invención

El uso de linfocitos T naturales y genomanipulados es un paradigma destacado para mejorar diversas patologías humanas. Por ejemplo, mientras que las plataformas terapéuticas tradicionales para el tratamiento del cáncer incluyen la extirpación quirúrgica de la masa tumoral, la radioterapia y la administración de quimioterápicos (Shewach, Chem. Rev., 109:2859-2861, 2009), la última década ha sido testigo de un resurgimiento en la aplicación de la inmunoterapia adoptiva a los regímenes de tratamiento del cáncer. Con la llegada de los tratamientos con receptores de antígenos quiméricos (CAR-T), han surgido nuevos procedimientos para la infusión a pacientes de linfocitos T autólogos y alogénicos reactivos a tumores (June, J. Clin. Invest., 117:1466-1476, 2007). Los tratamientos con CAR-T aprovechan los recursos de la respuesta inmunitaria adaptativa para promover la citotoxicidad de las células cancerosas y erradicar el material tumoral. Un motivo común en la inmunoterapia adoptiva es el uso de linfocitos T que presentan la capacidad de potenciar selectivamente la citotoxicidad en células que presentan antígenos tumorales específicos. Ejemplos de esta técnica incluyen la administración de linfocitos infiltrantes de tumores (Dudley et al., J. Immunother., 26:332-342, 2003), así como de linfocitos T autólogos o alogénicos que se han genomanipulado para presentar reactividad con un antígeno específico de tumor (Yee et al., PNAS, 99:16168-16173, 2002).

El documento WO 2014/124134 A1 se refiere a procedimientos para de producción de composiciones enriquecidas en Treg y procedimientos para tratar trastornos inmunológicos usando estas composiciones y composiciones que contienen anticuerpos agonistas del TNFR2, y procedimientos para producir composiciones enriquecidas en linfocitos y empobrecidas en Treg y el uso de estas composiciones y de composiciones que contienen anticuerpos antagonistas del TNFR2 en el tratamiento de trastornos proliferativos.

A pesar de la promesa de la inmunoterapia contra el cáncer basada en linfocitos T, el desarrollo de esta plataforma terapéutica se ha visto obstaculizado por la propensión natural del sistema inmunitario a suprimir los ataques inmunitarios generados en las células propias. Las células cancerosas, como todas las células humanas nucleadas, expresan proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I que distinguen estas células de las células exógenas. Para prevenir el fratricidio celular, se han desarrollado linfocitos T reguladores (linfocitos T-reg) que suprimen la actividad de los linfocitos T que presentan reactividad contra los antígenos MHC "propios". Los linfocitos T-reg representan una clase heterogénea de linfocitos T que se pueden distinguir en base a su presentación única de proteínas de superficie. Las poblaciones de linfocitos T-reg mejor conocidas incluyen linfocitos T-reg CD4+, CD25+, FoxP3+ y linfocitos T-reg CD17+. Los mecanismos exactos por los cuales estas células median la supresión de los linfocitos T autorreactivos son objeto de investigaciones en curso, aunque se ha demostrado que determinadas clases de linfocitos T-reg inhiben la producción de la citocina inductora de proliferación IL-2 en los linfocitos T diana y, además, pueden capturar IL-2 de células autorreactivas en virtud de la afinidad de CD25 (un subdominio del receptor de IL-2) por IL-2 (Josefowicz et al., Ann. Rev. Immun., 30:531-564, 2012).

Aunque los linfocitos T-reg desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica, los mismos rasgos característicos bioquímicos que fundamentan la capacidad de estas células para modular la actividad de los linfocitos T autorreactivos también sirven para socavar la inmunoterapia adoptiva y la respuesta inmunitaria natural al suprimir la actividad de los linfocitos T-reg reactivos a tumores. El desarrollo de moduladores químicos de la actividad de los linfocitos T-reg ha sido objeto de muchas investigaciones farmacológicas, ya que el acceso a un agente que pueda inhibir la supresión de linfocitos T mediada por T-reg podría mejorar enormemente el alcance y la eficacia de la inmunoterapia adoptiva contra el cáncer, así como mejorar la capacidad del sistema inmunitario para erradicar organismos patógenos que dan lugar a enfermedades infecciosas.

Los subtipos 1 y 2 del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) se han identificado en la superficie de los linfocitos T-reg como moléculas de transducción de señales que dictan el destino celular. La activación de TNFR1, por ejemplo, potencia la cascada de señalización de caspasas y termina en la apoptosis de T-reg, mientras que la activación de TNFR2 induce la señalización a través de la vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), que dirige la señalización a través de TRAF2/3 y la transcripción de genes mediada por NFκB que promueven la resistencia a la apoptosis y la proliferación celular. Debido a su papel en el control de la supervivencia y el crecimiento celulares, TNFR2 representa una diana atractiva para prevenir la detección

inmunitaria de linfocitos T reactivos a tumores. Por consiguiente, actualmente existe una necesidad de tratamientos que puedan prevenir la supervivencia y proliferación de los linfocitos T-reg para su uso en tratamientos dirigidos a trastornos de proliferación celular, tales como el cáncer, y a una amplia gama de enfermedades infecciosas.

5 Sumario de la invención

La invención se define por el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

10 La invención proporciona anticuerpos antagonistas humanizados o quiméricos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se pueden unir específicamente al receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2) humano, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

- 15 (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23);
- (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24);
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25);
- 20 (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26)
- (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27); y
- (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28);

25 o en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las CDR siguientes:

- (g) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDTYL (SEQ ID NO: 274);
- 30 (h) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos VDPEYGST (SEQ ID NO: 258);
- (i) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259);
- (j) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos QNINKY (SEQ ID NO: 260)
- 35 (k) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos YTS; y
- (l) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLIT (SEQ ID NO: 273).

40 De forma alternativa, en el presente documento se proporcionan anticuerpos antagonistas del receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR2) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tales como los que se unen específicamente a epítopos dentro del TNFR2 humano que contienen uno o más residuos de la secuencia KCRPG (SEQ ID NO: 19) o epítopos equivalentes en TNFR2 de primates no humanos (por ejemplo, bisontes o ganado bovino, como se describe en el presente documento) y que no se unen específicamente a epítopos dentro de TNFR2 humano que contienen la secuencia KCSPG (SEQ ID NO: 12) o epítopos equivalentes en TNFR2 de primates no humanos. La divulgación presenta adicionalmente anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que inhiben la actividad de otros miembros de la superfamilia de TNFR, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a estas proteínas en una configuración de dímero antiparalelo. Los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de una variedad de patologías, incluyendo cánceres y enfermedades infecciosas.

En el presente documento se divulgan polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se pueden unir específicamente a TNFR2 humano que contienen una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR-H1) y una CDR-H2 derivada de un anticuerpo anti-TNFR2 neutro y una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos JZ¹JZ²Z⁴JZ³JZ⁵(J)₂Z⁵Z²Z⁵(J)₂, JRJGDGJSJY(J)₂FDJ (SEQ ID NO: 278), JRJDGSY(J)₂FD(J)₃ (SEQ ID NO: 279), QZ¹VZ²Z⁴YZ³SZ⁵WYZ⁵Z²Z⁵ (SEQ ID NO: 265) o AZ¹DZ²Z⁴Z³Z⁵SPZ⁵Z²Z⁵WG (SEQ ID NO: 266), en la que

60 cada J es independientemente un aminoácido natural;

cada Z¹ es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico, tal como lisina, arginina e histidina;

65

cada Z^2 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico, tal como ácido aspártico y ácido glutámico;

5 cada Z^3 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico, tal como serina, treonina, asparagina y glutamina;

cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; y

10 cada Z^5 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral hidrófoba, tal como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina y metionina, triptófano, fenilalanina y tirosina. Como se usa en el presente documento en el contexto de una fórmula polipeptídica, los caracteres numéricos en notación de subíndice designan la cantidad del aminoácido precedente presente en la fórmula, y los caracteres numéricos en notación de superíndice designan el tipo del aminoácido precedente presente en la fórmula.

15 En el presente documento se divulgan polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se pueden unir específicamente a TNFR2 humano. Los polipéptidos (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden contener una o más de, o todas, las CDR siguientes:

- 20 (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5$ o $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5J$;
- (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_3Z^4Z^3J$ o $(J)_5Z^4Z^3J$;
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $JZ^1JZ^2Z^4JZ^3JZ^5(J)_2Z^5Z^2Z^5$ o $JZ^1JZ^2Z^4Z^3Z^5(J)_2Z^5Z^2Z^5(J)_2$;
- 25 (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_9Z^5$ o $(J)_5Z^5$;
- (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_6Z^3$ o $(J)_2Z^3$; y
- 30 (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_5Z^5(J)_2Z^3$ o $(J)_3Z^5(J)_4Z^3$;

en las que cada J es independientemente un aminoácido natural;

35 cada Z^1 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico, tal como lisina, arginina e histidina;

cada Z^2 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico, tal como ácido aspártico y ácido glutámico;

40 cada Z^3 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico, tal como serina, treonina, asparagina y glutamina;

cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; y

45 cada Z^5 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral hidrófoba, tal como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina y metionina, triptófano, fenilalanina y tirosina.

50 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede contener una región constante no natural (por ejemplo, una región constante humana), carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural o carecer de un dominio Fc por completo.

55 En el presente documento se divulgan adicionalmente polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se pueden unir específicamente a TNFR2 humano, en el que el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene uno o más de, o todas, los CDR siguientes:

- (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GJTF(J)₂Y (SEQ ID NO: 276) o GJTF(J)₂YJ (SEQ ID NO: 277);
- 60 (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₃GSJ o (J)₅GSJ;
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos JRJDGJSJY(J)₂FDJ (SEQ ID NO: 278) o JRJDGSY(J)₂FD(J)₃ (SEQ ID NO: 279);
- 65 (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₉Y o (J)₅Y;

- (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₆S o (J)₂S; y
- (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₅Y(J)₂T o (J)₃Y(J)₄T;
- 5 en las que cada J es independientemente un aminoácido natural. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede contener una región constante no natural (por ejemplo, una región constante humana), carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural o carecer de un dominio Fc por completo.
- 10 La divulgación también presenta polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se pueden unir específicamente a TNFR2 humano. El polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener las CDR siguientes:
- (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos Z⁴FZ³Z⁵SSZ⁵ o Z⁴YZ³Z⁵TDZ⁵X;
- 15 (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGZ⁴Z³Y (SEQ ID NO: 263) o VDPEYZ⁴Z³T (SEQ ID NO: 264);
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QZ¹VZ²Z⁴YZ³SZ⁵WYZ⁵Z²Z⁵ (SEQ ID NO: 265) o AZ¹DZ²Z⁴Z³Z⁵SPZ⁵Z²Z⁵WG (SEQ ID NO: 266);
- 20 (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMZ⁵ (SEQ ID NO: 267) o QNINKZ⁵ (SEQ ID NO: 268);
- (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAZ³ (SEQ ID NO: 269), TYZ³ o YTZ³; y
- (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRRNZ⁵PYZ³ (SEQ ID NO: 270) o CLQZ⁵VNLXZ³ (SEQ ID NO: 271);
- 30 en las que cada Z¹ es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico; cada Z² es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico; cada Z³ es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico;
- 35 cada Z⁴ es independientemente una glicina o alanina; cada Z⁵ es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba;
- 40 cada X es independientemente leucina o isoleucina. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede contener una región constante no natural (por ejemplo, una región constante humana), carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural o carecer de un dominio Fc por completo.
- 45 En otro aspecto, la divulgación presenta un polipéptido, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se puede unir específicamente a TNFR2 humano, en el que el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene las CDR siguientes:
- 50 (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23), GYTFTDYX (SEQ ID NO: 257) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a estas secuencias;
- 55 (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24), VDPEYGST (SEQ ID NO: 258) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a estas secuencias;
- 60 (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25), ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a estas secuencias;
- 65 (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26), QNINKY (SEQ ID NO: 260) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos

sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a estas secuencias;

5 (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27), TYS, YTS o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a SEQ ID NO: 27; y

10 (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28), CLQYVNLXT (SEQ ID NO: 261) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, una o dos sustituciones aminoacídicas, tales como sustituciones aminoacídicas conservadoras) con respecto a estas secuencias;

15 en las que cada X es independientemente leucina o isoleucina. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede contener una región constante no natural (por ejemplo, una región constante humana), carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carecer de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural o carecer de un dominio Fc por completo. En algunos modos de realización, las sustituciones aminoacídicas son sustituciones conservadoras. En algunos modos de realización, las sustituciones aminoacídicas son sustituciones no conservadoras.

20 En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene una o más de las CDR siguientes:

(a) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26);

25 (b) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27); y

(c) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28).

30 En algunos modos de realización, el polipéptido (polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene una o más de las CDR siguientes:

(a) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos QNINKY (SEQ ID NO: 260);

35 (b) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos TYS o YTS; y

(c) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLXT (SEQ ID NO: 261).

40 En algunos modos de realización, la CDR-L2 del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene la secuencia de aminoácidos TYS. En algunos modos de realización, la CDR-L2 del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene la secuencia de aminoácidos YTS. En algunos modos de realización, la CDR-L3 tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLIT (SEQ ID NO: 273).

45 En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene una o más de las CDR siguientes:

(a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23);

50 (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24); y

(c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWFYFDV (SEQ ID NO: 25).

55 En algunos modos de realización, el polipéptido (polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene una o más de las CDR siguientes:

(a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYX (SEQ ID NO: 257);

(b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos VDPEYGST (SEQ ID NO: 258); y

60 (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDDGSYSYFDYWG (SEQ ID NO: 259).

En algunos modos de realización, la CDR-H1 tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYL (SEQ ID NO: 274). En algunos modos de realización, la CDR-H1 tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYI (SEQ ID NO: 275).

65 En algunos modos de realización de la invención, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene:

- (a) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26);
- (b) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27); y
- (c) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28).

El polipéptido (polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener:

- (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23);
- (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24); y
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25).

En algunos modos de realización, el polipéptido (polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene:

- (a) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos QNINKY (SEQ ID NO: 260);
- (b) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos TYS o YTS; y
- (c) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLXT (SEQ ID NO: 261).

En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene:

- (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFTDYX (SEQ ID NO: 257);
- (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos VDPEYGST (SEQ ID NO: 258); y
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259).

En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) incluye una región estructural que contiene la secuencia de aminoácidos LLIR (SEQ ID NO: 262) unida al extremo N de la región CDR-L2. En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) incluye una región estructural que contiene la secuencia de aminoácidos TLE unida al extremo C de la región CDR-L2.

La divulgación también presenta un polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une específicamente a TNFR2 y que contiene una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región constante no natural. En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) contiene una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera que tiene al menos un 90 % (por ejemplo, un 95 %, 97 %, 99 % o 100 %) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. El polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener adicionalmente una secuencia de la cadena pesada que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener una cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener una cadena ligera que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener una cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la invención proporciona construcciones que contienen un primer dominio polipeptídico y un segundo dominio polipeptídico, cada uno de los cuales contiene un polipéptido monocatenario de la invención. El primer y segundo dominios polipeptídicos pueden ser iguales. En algunos modos de realización, el primer y segundo dominios polipeptídicos pueden ser diferentes. El primer y segundo dominios polipeptídicos se pueden unir por un conector, tal como un conector que contiene un enlace amida o un puente disulfuro. Las construcciones pueden carecer de un dominio Fc murino.

Los modos de realización de la divulgación también presentan un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 con una K_D inferior a aproximadamente 100 nM y no se une a un péptido que comprende los aminoácidos 56-60 (KCSPG) de SEQ ID NO: 7, y contiene una región constante no natural (por ejemplo, contiene una región constante humana), carece de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carece de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural, o carece de un dominio Fc por completo. La divulgación también presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se puede unir específicamente a TNFR2 humano, en la que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un péptido que comprende uno o más de los aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7 (KCRPG) y no se une a un péptido que comprende los aminoácidos 56-60 de SEQ ID NO: 7 (KCSPG), y contiene una región constante no natural (por ejemplo, contiene una región constante humana), carece de la totalidad o de una parte de un dominio Fc, carece de la totalidad o de una parte de un dominio Fc natural, o carece de un dominio Fc por completo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir específicamente al péptido que contiene uno o más de los aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7 (KCRPG) con una K_D inferior a aproximadamente 10 nM. Opcionalmente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 142-149 de SEQ ID NO: 7 (KCRPGFVG). De forma alternativa o adicionalmente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos 137-144 de SEQ ID NO: 7 (CAPLRKCR). En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir específicamente a un epítipo que contiene al menos cinco residuos discontinuos o continuos dentro de los aminoácidos 150-190 de SEQ ID NO: 7 (RPGTETSDVCKPCAPGTFSTNTSSDTCRPHQICNVVAI). El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir opcionalmente a un epítipo dentro de los aminoácidos 161-169 de SEQ ID NO: 7 (CKPCAPGTF). En otros casos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a un epítipo que contiene al menos cinco residuos discontinuos o continuos dentro de los aminoácidos 75-128 de SEQ ID NO: 7 (CDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRSSDQVETQACTREQNRICRPGWYCAL). En particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir al epítipo dentro de uno o más de los aminoácidos 80-86 (DSTYTQL), 91-98 (PECLSCGS) y 116-123 (RICTCRPG) de SEQ ID NO: 7.

En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 112-131 de SEQ ID NO: 7 (REQNRICRPGWYCALSKQ). El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a un epítipo dentro de los aminoácidos 120-139 de SEQ ID NO: 7 (CRPGWYCALSKQEGCRLCAP). Adicionalmente o de forma alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a un epítipo dentro de los aminoácidos 128-147 de SEQ ID NO: 7 (LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF). En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 136-155 de SEQ ID NO: 7 (LCAPLRKCRPGFVGVARPGTE).

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la divulgación pueden inhibir la señalización de TNFR2. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce o inhibe la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB y cIAP2/BIRC3. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la activación de NPkB. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden reducir o inhibir la expresión o modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación) de uno o más de CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB o cIAP2/BIRC3, por ejemplo, en un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % con respecto a la expresión o modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación) de una o más de estas moléculas aisladas de una muestra no tratada con un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación. Los ensayos ejemplares que se pueden usar para determinar el nivel de expresión y el estado de fosforilación son conocidos en la técnica e incluyen ensayos de inmunoelectrotransferencia para determinar el contenido de proteínas y experimentos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativos para determinar el contenido de ARNm. En modos de realización preferentes, los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) son antagonistas dominantes de TNFR2 y, por tanto, pueden inhibir la activación de TNFR2 incluso en presencia de un agonista del TNFR2 (tal como TNF α) o un agente promotor de crecimiento, tal como IL-2.

El polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación se puede unir a TNFR2 con una K_D no mayor que aproximadamente 10 nM, no mayor que 1 nM o, en casos particulares, con una K_D de aproximadamente 621 pM. Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación se pueden unir a TNFR2 o a un epítipo del mismo como se describe en el presente documento con una K_D de aproximadamente 1 pM a aproximadamente 900 pM (por ejemplo, aproximadamente 1 pM, 2 pM, 3 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM, 8 pM, 9 pM, 10 pM, 20 pM, 30 pM, 40 pM, 50 pM, 60 pM, 70 pM, 80 pM, 90 pM, 100 pM, 110 pM, 120 pM, 130 pM, 140 pM, 150 pM, 160 pM, 170 pM, 180 pM, 190 pM o 200 pM, 300 pM, 310 pM, 320 pM, 330 pM, 340 pM, 350 pM, 360 pM, 370 pM, 380 pM, 390 pM, 400 pM, 410 pM, 420 pM, 430 pM, 440 pM, 450 pM, 460 pM, 470 pM, 480 pM, 490 pM, 500 pM, 510 pM, 520 pM, 530 pM, 540 pM, 550 pM, 560 pM, 570 pM, 580 pM, 590 pM,

600 pM, 610 pM, 620 pM, 630 pM, 640 pM, 650 pM, 660 pM, 670 pM, 680 pM, 690 pM, 700 pM, 710 pM, 720 pM, 730 pM, 740 pM, 750 pM, 760 pM, 770 pM, 780 pM, 790 pM, 800 pM, 810 pM, 820 pM, 830 pM, 840 pM, 850 pM, 860 pM, 870 pM, 880 pM, 890 pM o 900 pM). En algunos modos de realización, el polipéptido (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) se une a TNFR2 con una K_D de aproximadamente 44 pM, por ejemplo, 44,4 pM. En determinados casos, los anticuerpos anti-TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación se pueden unir a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno con una k_{on} de al menos aproximadamente $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y, en algunos modos de realización, con una k_{on} de aproximadamente $3,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación se pueden unir a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno con una k_{on} de desde aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (por ejemplo, aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno con una k_{on} de aproximadamente $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, por ejemplo, $4,98 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación se pueden unir a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno, en el que el complejo se disocia con una k_{off} no mayor que aproximadamente 10^{-3} s^{-1} . En algunos modos de realización, el complejo se disocia con una k_{off} no mayor que aproximadamente 10^{-4} s^{-1} , por ejemplo, con una k_{off} de aproximadamente $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación se pueden unir a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno, en el que el complejo se disocia con una k_{off} de desde aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (por ejemplo, aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). En algunos modos de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a TNFR2 para formar un complejo anticuerpo-antígeno, en el que el complejo se disocia con una k_{off} no mayor que aproximadamente $2,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, por ejemplo, aproximadamente $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En algunos modos de realización, el complejo se disocia con una k_{off} de aproximadamente $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación pueden ser capaces de reducir o inhibir la proliferación de una población de linfocitos T-reg, y pueden hacerlo opcionalmente en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α . En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir o inhibir la proliferación de una población de células cancerosas que expresan TNFR2, y puede hacerlo opcionalmente en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α . Por ejemplo, las células cancerosas pueden ser células de linfoma hodgkiniano, células de linfoma cutáneo no hodgkiniano, células de linfoma de linfocitos T, células de cáncer de ovario, células de cáncer de colon, células de mieloma múltiple o células de carcinoma de células renales. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir o inhibir la proliferación de una población de células supresoras derivadas de mieloides, y opcionalmente puede hacerlo en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α . En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir o inhibir selectivamente la proliferación de una población de linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi}, tal como una población de linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi} y CD45RA^{Low}. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser capaz de reducir la proliferación de una población de linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi} y CD45RA^{Low} (es decir, una población de linfocitos T-reg activados o linfocitos aT-reg) en, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más con respecto a una población de linfocitos T-reg que no expresan las proteínas CD25^{Hi} y CD45RA^{Low}, tal como una población de linfocitos T-reg que expresa las proteínas CD25^{Med} y CD45RA^{Hi} (es decir, una población de linfocitos T-reg en reposo o linfocitos rT-reg).

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación se pueden unir adicionalmente a TNFR2 en la superficie de una célula cancerosa, tal como una célula tumoral. La unión de TNFR2 a la célula cancerosa puede inhibir o reducir la proliferación de la célula cancerosa o puede promover la apoptosis de la célula cancerosa.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocaténarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación también se pueden unir a TNFR2 en la superficie de una célula supresora derivada de mielóide (MDSC; por ejemplo, una célula que expresa la totalidad o un subconjunto de proteínas y moléculas pequeñas seleccionadas del grupo que consiste en B7-1 (CD80), B7-H1 (PD-L1), CCR2, CD1d, CD1d1, CD2, CD31 (PECAM-1), CD43, CD44, componente del complemento C5a R1, F4/80 (EMR1), Fc γ RI (CD16), Fc γ RI (CD32), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIB (CD32b), Fc γ RIIB/C (CD32b/c), Fc γ RIIC (CD32c), Fc γ RIIC (CD32c), Fc γ RIIC (CD32c), Fc γ RIIC (CD32c), galectina-3, GP130, Gr-1 (Ly-6G), ICAM-1 (CD54), IL-1RI, IL-4R α , IL-6R α , integrina α 4 (CD49d), integrina α L (CD11a), integrina α M (CD11b), M-CSFR, MGL1 (CD301a), MGL1/2 (CD301a/b), MGL2 (CD301b), óxido nítrico, PSGL-1 (CD162), L-selectina (CD62L), siglec-3 (CD33), receptor de transferrina (TfR), VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (KDR o Flk-1). En particular, las MDSC no expresan proteínas seleccionadas del grupo que consiste en B7-2 (CD86), B7-H4, CD11c, CD14, CD21, CD23 (Fc ϵ RII), CD34, CD35, CD40 (TNFRSF5), CD117 (c-kit), HLA-DR y Sca-1 (Ly6). La unión de TNFR2 a la MDSC puede inhibir o reducir la proliferación de las MDSC o puede promover la apoptosis de las MDSC.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación pueden demostrar la capacidad de atenuar la proliferación de linfocitos T-reg y/o células cancerosas en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α o un anticuerpo agonista del TNFR2, o moléculas promotoras de crecimiento, tal como IL-2. Estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden unir a TNFR2 y estabilizar la conformación dimérica del dímero antiparalelo de este receptor y evitar la fosforilación y otras modificaciones postraduccionales que se producen durante la señalización de NPkB.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación pueden reducir la cantidad total de linfocitos T-reg o células cancerosas en un paciente (tal como un paciente humano) o dentro de una muestra (por ejemplo, una muestra aislada de un paciente, tal como un paciente humano sometido a tratamiento para el cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento con respecto a una muestra aislada de un paciente no sometido a dicho tratamiento o con respecto a una muestra aislada del paciente antes de recibir este tratamiento).

En algunos modos de realización, el polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) reduce la expresión de TNFR2, por ejemplo, por un linfocito T-reg o una célula cancerosa (tal como una célula de linfoma hodgkiniano o linfoma cutáneo no hodgkiniano, célula de linfoma de linfocitos T, célula de cáncer de ovario, célula de cáncer de colon, célula de mieloma múltiple o célula de carcinoma de células renales).

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la divulgación pueden inhibir la proliferación o reducir la cantidad total de una población de linfocitos T-reg en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) o en una muestra (por ejemplo, una muestra aislada de un paciente humano sometido a tratamiento para el cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento).

La divulgación también presenta un procedimiento para identificar un polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) mediante:

(a) exposición de una mezcla heterogénea de anticuerpos o fragmentos de los mismos a al menos un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7; y

(b) retención de los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a dicho péptido y retirada de los anticuerpos o fragmentos de los mismos que no se unen específicamente a dicho péptido, produciendo de este modo una mezcla de anticuerpos enriquecida que comprende al menos un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunos modos de realización, se puede determinar la secuencia de aminoácidos de uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en la mezcla de anticuerpos enriquecida. Opcionalmente, el péptido se puede unir a una superficie y, en algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede expresar en la superficie de un fago, una célula bacteriana o una célula de levadura. En casos alternativos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se expresa como una o más cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente a ribosomas o unidas covalentemente a ARNm o ADNc. En casos particulares, el péptido se puede conjugar con un marcador detectable, tal como una molécula fluorescente, una marca de epítipo o un radiomarcador. En algunos casos, la molécula fluorescente puede ser proteína fluorescente verde, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente roja, ficoeritrina, alofococianina, hoescht, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, fluoresceína, cumarina, rodamina, tetrametilrodamina o cianina. En determinados modos de realización, la marca de epítipo puede ser una proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, una marca de polihistidina, una marca FLAG, una marca myc, una marca de hemaglutinina (HA) de gripe humana, biotina o estreptavidina. Además, en algunos modos de realización, las etapas (a) y (b) anteriores se pueden repetir secuencialmente una o más veces.

La divulgación también presenta un procedimiento de producción de un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo mediante inmunización de un mamífero no humano con un péptido que comprende la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7 y recogida del suero que contiene el anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los mamíferos no humanos ejemplares que se pueden inmunizar incluyen un conejo, ratón, rata, cabra, cobaya, hámster, caballo y oveja. En algunos modos de realización, el péptido usado para la inmunización puede contener la secuencia de aminoácidos KCRPG (SEQ ID NO: 19). En algunos casos, el péptido usado para la inmunización puede contener la secuencia de aminoácidos CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11). Opcionalmente, el péptido puede contener la secuencia de aminoácidos KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20).

La invención presenta un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo policlonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo primatizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un dominio de inmunoglobulina variable dual, un anticuerpo monovalente o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un diacuerpo, un triacuerpo, un nanocuerpo, un andamio proteico similar a un anticuerpo, un anticuerpo de dominio, un fragmento Fv, un fragmento Fab, una molécula F(ab')₂ y un scFv en tándem (taFv). En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es una molécula F(ab')₂. En algunos modos de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

En algunos modos de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede conjugar con un agente terapéutico, tal como un agente citotóxico.

La invención presenta un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, así como un vector que contiene dicho polinucleótido. El vector puede ser un vector de expresión, tal como un vector de expresión eucariótico, o un vector vírico, tal como un adenovirus (Ad, tal como adenovirus de serotipo 5, 26, 35 o 48), retrovirus (tal como un γ-retrovirus o un lentivirus), poxvirus, virus adenoasociado, baculovirus, virus del herpes simple o un virus vaccinia (tal como un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA)). La invención también presenta células huésped, tales como células procariotas y eucariotas (por ejemplo, de mamíferos) que contienen un vector de la invención.

La invención también presenta un procedimiento de producción de un polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) de la invención mediante expresión de un polinucleótido que codifica el polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula huésped y recuperación del polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del medio de la célula huésped.

La invención también presenta una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención para su uso en un procedimiento para inhibir una respuesta inmunitaria mediada por un linfocito T regulador, así como para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno de proliferación celular en un humano, mediante la administración de un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector o célula huésped de la invención al ser humano que necesita tratamiento. Adicionalmente, la invención también presenta una composición que contiene un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector o célula huésped de la invención para su uso en la inhibición de una respuesta inmunitaria mediada por un linfocito T regulador, así como para su uso en el tratamiento de un trastorno de proliferación celular en un ser humano.

En algunos modos de realización, el trastorno de proliferación celular es un cáncer, tal como leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer cardíaco, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad bucal, cáncer ocular, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer testicular o cáncer de garganta. En casos particulares, el trastorno de proliferación celular puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (MLC), carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con SIDA, linfoma primario del SNC, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoideo/rabdoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer extrahepático, familia del sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, tumores embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso, craneofaringioma, ependimoma, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma primario, cordoma, neoplasias mieloproliferativas crónicas, cáncer de colon, cáncer de vías biliares extrahepático, carcinoma ductal in situ (CDIS), cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de trompas de Falopio, histiocitoma fibroso de hueso, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales testiculares, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, glioma de tronco encefálico infantil, leucemia de células pilosas, cáncer hepatocelular, histiocitosis de células de Langerhans, linfoma hodgkiniano, cáncer de hipofaringe, tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos de páncreas, tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles, histiocitosis de células de Langerhans, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma cutáneo de linfocitos T, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso de cuello metastásico, carcinoma de línea media, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, cáncer de cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), cáncer de ovario epitelial, cáncer de ovario de células germinales, cáncer de ovario de bajo

potencial maligno, tumores neuroendocrinos de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de senos paranasales y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer peritoneal primario, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de Kaposi, rhabdomyosarcoma, síndrome de Sézary, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y del uréter, cáncer uretral, cáncer de endometrio uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva y macroglobulinemia de Waldenström.

La invención también presenta un polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), un polinucleótido, vector o célula huésped para su uso en procedimientos de tratamiento del linfoma hodgkiniano o del linfoma cutáneo no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma múltiple o carcinoma de células renales mediante la administración del polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), polinucleótido, vector o célula huésped de la invención a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero, tal como un paciente humano). Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en un procedimiento para tratar el cáncer de ovario mediante la administración de un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero, tal como un paciente humano). La invención presenta además una composición que contiene un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector o célula huésped de la invención para su uso en el tratamiento del linfoma hodgkiniano o linfoma cutáneo no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma múltiple o carcinoma de células renales en un paciente (por ejemplo, un paciente humano).

La invención también presenta una composición que comprende el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, polipéptido o construcción para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad infecciosa en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) mediante administración de un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector o célula huésped de la invención al ser humano que necesita tratamiento, así como una composición que contiene un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, polinucleótido, vector o célula huésped de la invención para tratar una enfermedad infecciosa en un paciente (por ejemplo, un paciente humano). En algunos modos de realización, la enfermedad infecciosa puede ser causada por un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. Por ejemplo, las infecciones víricas que se pueden tratar de acuerdo con las composiciones para su uso de la invención incluyen el virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus Kadam, virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur, virus Langat, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus Powassan, virus Royal Farm, virus Karshi, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus Neudoerfl, virus Sofjin, virus de la encefalomiелitis ovina, virus Negishi, virus Meaban, virus Saumarez Reef, virus Tyuleny, virus Aroa, virus del dengue, virus Kedougou, virus Cacipacore, virus Koutango, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis del Valle de Murray, virus de la encefalitis de San Luis, virus Usutu, virus del Nilo Occidental, virus de Yaundé, virus Kokobera, virus Bagaza, virus Ilhéus, virus de la meningoencefalomiелitis del pavo de Israel, virus Ntaya, virus Tembusu, virus Zika, virus Banzí, virus Bouboui, virus Edge Hill, virus Jugra, virus Saboya, virus Sepik, virus Uganda S, virus Wesselsbron, virus de la fiebre amarilla, virus del murciélago de Entebbe, virus Yokose, virus Apoi, virus Cowbone Ridge, virus Jutiapa, virus Modoc, virus Sal Vieja, virus San Perilita, virus del murciélago de Bukalasa, virus de Carey Island, virus del murciélago de Dakar, virus de la leucoencefalitis myotidis de Montana, virus del murciélago de Phnom Penh, virus del Río Bravo, virus del murciélago de Tamana, virus del agente de fusión celular, virus Ippy, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia, virus Amapari, virus Flexal, virus Guanarito, virus Junin, virus Latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Whitewater Arroyo, virus Chapare, virus Lujo, virus Hantaan, virus Sin Nombre, virus Dugbe, virus Bunyamwera, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de La Crosse, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC), virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina occidental (EEO), virus Sindbis, virus de la rubéola, virus del bosque de Semliki, virus del río Ross, virus del bosque de Barmah, virus O'nyong'nyong y el virus chikungunya, virus de la viruela, virus de la viruela del simio, virus vaccinia, virus del herpes simple, virus del herpes humano, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la varicela-zóster, virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), virus de la gripe, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus respiratorio sincitial humano (RSV), virus de la enfermedad de Newcastle, hendravírus, nipahvírus, virus del sarampión, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus Sendai, virus paragripal humano (por ejemplo, 1, 2, 3 y 4), rinovirus, virus de las paperas, poliovirus, enterovirus humano (A, B, C y D), virus de la hepatitis A, virus coxsackie, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus adenoasociados, astrovirus, virus JC, virus BK, virus SV40, virus Norwalk, rotavirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus linfotrópico T humano tipos I y II y encefalopatía espongiforme transmisible, tal como la enfermedad consuntiva crónica.

En algunos modos de realización, las infecciones bacterianas que se pueden tratar de acuerdo con las composiciones para su uso de la invención incluyen aquellas causadas por una bacteria que pertenece a un género

seleccionado del grupo que consiste en *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Neisseria*, *Actinobacter*, *Moraxella*, *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *E. coli*, tal como O157:H7), *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Legionella*, *Pasturella*, *Francisella*, *Brucella*, *Bartonella*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Staphylococcus*.

Además, las infecciones parasitarias que se pueden tratar de acuerdo con las composiciones para su uso de la invención incluyen las causadas por *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium muris*, *Trypanosomatida gambiense*, *Trypanosomatida rhodesiense*, *Trypanosomatida cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis* e *Histomonas meleagridis*. Los parásitos helmínticos ejemplares incluyen *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti* y *Dracunculus medinensis*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Heterophyes*, *Paragonimus westermani*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* o *Echinococcus granulosus*.

La invención también presenta kits, tales como un kit que contiene un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención (por ejemplo, un anticuerpo antagonista del TNFR2), un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula huésped de la invención. En algunos casos, los kits de la invención pueden contener instrucciones para transfectar un vector de la invención en una célula huésped de la invención. Opcionalmente, los kits pueden contener instrucciones para (y opcionalmente, un reactivo que se puede usar para) expresar un polipéptido monocatenario, construcción, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en una célula huésped de la invención. Un kit de la invención también puede contener instrucciones para administrar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula huésped de la invención a un paciente humano. Opcionalmente, un kit puede contener instrucciones para preparar o usar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención o una célula huésped de la invención.

La divulgación presenta adicionalmente un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que se une específicamente a un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRS) en una conformación de dímero antiparalelo. El polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede contener opcionalmente una región constante no natural. Por ejemplo, el polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inhibir la trimerización del miembro de la TNFRS, por ejemplo, en presencia de un agonista del miembro de la TNFRS, tal como un ligando miembro de la TNFRS afín. El polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inhibir la señalización de NPKB en una célula, tal como una célula eucariota (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana o bovina). En algunos modos de realización, el polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce o inhibe la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB y cIAP2/BIRC3. El miembro de la TNFRS se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en TNFR1, TNFR2, Fas, DCR3, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, DR6, EDAR, CD271, OPG, RANK, LTβR, TWEAK-R, HVEM, CD27, CD30, CD40, CD137, OX40, GITR, BCMA, TACI, BAFFR, EDAR2, TROY y RELT. Por ejemplo, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la divulgación se pueden unir a TNFR2 en una conformación de dímero antiparalelo, por ejemplo, evitando de este modo la trimerización mediada por TNFα y la activación de este receptor.

La invención presenta adicionalmente un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad mediada por señalización a través de un miembro de la TNFRS en un paciente (por ejemplo, un paciente humano) administrando al ser humano el polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un miembro de la TNFRS en una conformación de dímero antiparalelo como se describe anteriormente. Adicionalmente, el polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso presenta una composición que contiene un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un miembro de la TNFRS en una conformación de dímero antiparalelo para tratar una enfermedad mediada por señalización a través de un miembro de la TNFRS en un paciente (por ejemplo, un paciente humano). En algunos modos de realización, el miembro de la TNFRS es TNFR1, TNFR2, Fas, DCR3, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, DR6, EDAR, CD271, OPG, RANK, LTβR, TWEAK-R, HVEM, CD27, CD30, CD40, CD137, OX40, GITR, BCMA, TACI, BAFFR, EDAR2, TROY o RELT. En algunos modos de realización, el miembro de la TNFRS es TNFR2. La enfermedad mediada por señalización a través de un miembro de la TNFRS, tal como TNFR2, puede ser un cáncer. Por ejemplo, el cáncer puede ser linfoma de hodgkiniano, linfoma cutáneo no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma múltiple o carcinoma de células renales.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a un valor que no está más del 10 % por encima o por debajo del valor que se describe. Por ejemplo, el término "aproximadamente 5 nM" indica un intervalo de desde 4,5 nM hasta 5,5 nM.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" (Ab) se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a, o es inmunológicamente reactiva con, un antígeno particular, e incluye formas de anticuerpos policlonales, monoclonales, genomanipulados y de otro modo modificados, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos bi-, tri- y tetraespecíficos, diacuerpos, tricuerpos y tetracuerpos) y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rIgG y scFv. Además, a menos que se indique de otro modo, el término "anticuerpo monoclonal" (mAb) pretende incluir tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpo (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂) que se pueden unir específicamente a una proteína diana. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación del animal y pueden tener menos unión tisular no específica que un anticuerpo intacto (véase Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316, 1983).

El término "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno diana. La función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser un Fab, F(ab')₂, scFv, SMIP, diacuerpo, un triacuerpo, un aficuerpo, un nanocuerpo, un aptámero o un dominio de anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión que abarca el término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye dominios V_H y V_L; (vi) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio V_H; (vii) un dAb que consiste en un dominio V_H o un V_L; (viii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada; y (ix) una combinación de dos o más CDR aisladas que se pueden unir opcionalmente mediante un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican por genes separados, se pueden unir, usando procedimientos recombinantes, mediante un conector que les permite convertirse en una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426, 1988 y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Estos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y la utilidad de los fragmentos se puede cribar de la misma manera que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas o, en algunos modos de realización, mediante procedimientos de síntesis química de péptidos conocidos en la técnica.

Como se usan en el presente documento, los términos "anticuerpo antirreceptor 2 del factor de necrosis tumoral", "anticuerpo contra TNFR2", "porción de anticuerpo anti-TNFR2" y/o "fragmento de anticuerpo anti-TNFR2" y similares incluyen cualquier proteína o molécula que contenga péptido que incluye al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como pero sin limitarse a al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o la cadena ligera, una región estructural o cualquier porción de la misma, que se puede unir específicamente a TNFR2. Los anticuerpos contra TNFR2 también incluyen andamios proteicos similares a anticuerpos, tales como el décimo dominio de fibronectina tipo III (¹⁰Fn3), que contiene bucles estructurales BC, DE y FG similares en estructura y accesibilidad a disolventes a las CDR de anticuerpos. La estructura terciaria del dominio ¹⁰Fn3 se asemeja a la de la región variable de la cadena pesada de IgG, y un experto en la técnica puede injertar, por ejemplo, las CDR de un anticuerpo monoclonal contra TNFR2 en el andamio de fibronectina reemplazando residuos de bucles BC, DE y FG de ¹⁰Fn3 por residuos de las regiones CDR-H1, CDR-H2 o CDR-H3 de un anticuerpo monoclonal contra TNFR2.

Como se usan en el presente documento, el término "anticuerpo antagonista del TNFR2" se refiere a anticuerpos contra TNFR2 que pueden inhibir o reducir la activación de TNFR2 y/o atenuar una o más vías de transducción de señales mediadas por TNFR2. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden inhibir o reducir el crecimiento y la proliferación de una población de linfocitos T reguladores. Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden inhibir o reducir la activación de TNFR2 al bloquear la unión de TNFR2 a TNFα. De esta manera, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden bloquear la trimerización de TNFR2 que de otro modo se induciría al interactuar con TNFα, dando como resultado por tanto la supresión de la actividad de TNFR2.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos biespecíficos" se refiere a anticuerpos monoclonales, a menudo humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En la divulgación, una de las especificidades de unión se puede dirigir hacia TNFR2, la otra puede ser por cualquier otro antígeno, por ejemplo, por una proteína de superficie celular, receptor, subunidad del

receptor, antígeno específico de tejido, proteína derivada de virus, proteína de envoltura codificada por virus, proteína derivada de bacterias o proteína de superficie bacteriana, etc.

Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina de un organismo fuente, tal como rata o ratón, y regiones constantes derivadas de una inmunoglobulina de un organismo diferente (por ejemplo, un ser humano). Se conocen en la técnica procedimientos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229(4719): 1202-7; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al., 1985, J. Immunol. Methods 125:191-202; patentes de EE. UU. n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.

Como se usa en el presente documento, el término "región determinante de complementariedad" (CDR) se refiere a una región hipervariable que se encuentra tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Como se aprecia en la técnica, las posiciones de los aminoácidos que delimitan una región hipervariable de un anticuerpo pueden variar dependiendo del contexto y de las diversas definiciones conocidas en la técnica. Algunas posiciones dentro de un dominio variable se pueden ver como posiciones hipervariables híbridas en el sentido de que se puede considerar que estas posiciones están dentro de una región hipervariable según un conjunto de criterios, mientras que se consideran fuera de una región hipervariable según un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también se pueden encontrar en regiones hipervariables extendidas. La divulgación incluye anticuerpos que comprenden modificaciones en estas posiciones hipervariables híbridas. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones estructurales que adoptan principalmente una configuración de lámina β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FR en el orden FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y, con las CDR de las otras cadenas de anticuerpo, contribuyen a la formación del sitio de unión a diana de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987). Como se usa en el presente documento, la numeración de los residuos aminoacídicos de inmunoglobulina se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de residuos aminoacídicos de inmunoglobulina de Kabat et al., a menos que se indique de otro modo.

Como se usan en el presente documento, los términos "mutación conservadora", "sustitución conservadora" o "sustitución aminoacídica conservadora" se refieren a una sustitución de uno o más aminoácidos por uno o más aminoácidos diferentes que presentan propiedades fisicoquímicas similares, tales como polaridad, carga electrostática y volumen estérico. Estas propiedades se resumen para cada uno de los veinte aminoácidos naturales en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas representativas de los aminoácidos naturales.

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carácter electrostático a pH fisiológico (7,4)	Volumen estérico [†]
Alanina	Ala	A	no polar	neutro	pequeño
Arginina	Arg	R	polar	catiónico	grande
Asparagina	Asn	N	polar	neutro	intermedio
Ácido aspártico	Asp	D	polar	aniónico	intermedio
Cisteína	Cys	C	no polar	neutro	intermedio
Ácido glutámico	Glu	E	polar	aniónico	intermedio
Glutamina	Gln	Q	polar	neutro	intermedio
Glicina	Gly	G	no polar	neutro	pequeño
Histidina	His	H	polar	Ambas formas neutra y catiónica en equilibrio a pH 7,4	grande
Isoleucina	Ile	I	no polar	neutro	grande
Leucina	Leu	L	no polar	neutro	grande
Lisina	Lys	K	polar	catiónico	grande
Metionina	Met	M	no polar	neutro	grande
Fenilalanina	Phe	F	no polar	neutro	grande

Aminoácido	Código de 3 letras	Código de 1 letra	Polaridad de cadena lateral	Carácter electrostático a pH fisiológico (7,4)	Volumen estérico [†]
Prolina	Pro	P	no polar	neutro	intermedio
Serina	Ser	S	polar	neutro	pequeño
Treonina	Thr	T	polar	neutro	intermedio
Triptófano	Trp	W	no polar	neutro	voluminoso
Tirosina	Tyr	Y	polar	neutro	grande
Valina	Val	V	no polar	neutro	intermedio

[†] basado en el volumen en Å³: 50-100 es pequeño, 100-150 es intermedio, 150-200 es grande y >200 es voluminoso

De esta tabla se aprecia que las familias de aminoácidos conservadoras incluyen (i) G, A, V, L e I; (ii) D y E; (iii) C, S y T; (iv) H, K y R; (v) N y Q; y (vi) F, Y y W. Por lo tanto, una mutación o sustitución conservadora es aquella que sustituye un aminoácido por un miembro de la misma familia de aminoácidos (por ejemplo, una sustitución de Ser por Thr o de Lys por Arg).

Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a un compuesto formado por la unión química de un grupo funcional reactivo de una molécula con un grupo funcional apropiadamente reactivo de otra molécula.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos derivatizados" se refiere a anticuerpos que se han modificado mediante una reacción química para escindir residuos o añadir restos químicos no naturales a un anticuerpo aislado. Los anticuerpos derivatizados se pueden obtener mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante adición de grupos químicos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína. Cualquiera de una variedad de modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc., usando procedimientos establecidos. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales, por ejemplo, usando tecnología de supresión ámbar (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.964.859).

Como se usa en el presente documento, el término "diacuerpos" se refiere a anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas polipeptídicas, en las que cada cadena polipeptídica incluye dominios V_H y V_L unidos por un conector que es demasiado corto (por ejemplo, un conector compuesto por cinco aminoácidos) para permitir la asociación intramolecular de dominios V_H y V_L en la misma cadena peptídica. Esta configuración obliga a cada dominio a emparejarse con un dominio complementario en otra cadena polipeptídica para formar una estructura homodimérica. En consecuencia, el término "tricuerpos" se refiere a anticuerpos trivalentes que comprenden tres cadenas peptídicas, cada una de las cuales contiene un dominio V_H y un dominio V_L unidos por un conector que es excesivamente corto (por ejemplo, un conector compuesto de 1-2 aminoácidos) para permitir la asociación intramolecular de dominios V_H y V_L dentro de la misma cadena peptídica. Para plegarse en su estructura natural, los péptidos configurados de esta manera típicamente trimerizan para posicionar los dominios V_H y V_L de las cadenas peptídicas vecinas espacialmente próximas entre sí para permitir un plegamiento adecuado (véase Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993).

Como se usa en el presente documento, un "antagonista dominante" de TNFR2 es un antagonista (por ejemplo, un polipéptido antagonista, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que puede inhibir la activación de TNFR2 incluso en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α , o IL-2. Por ejemplo, un antagonista del TNFR2 es un antagonista dominante si la CI₅₀ del antagonista se incrementa en menos de un 200 % (por ejemplo, menos de un 200 %, 100 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 1 % o menos) en presencia de un agonista del TNFR2 (por ejemplo, TNF α) o IL-2 con respecto a la CI₅₀ del antagonista medida en el mismo ensayo en ausencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α , o IL-2. La inhibición de la activación de TNFR2 se puede evaluar, por ejemplo, midiendo la inhibición de la proliferación de una población de células TNFR2+, tales como linfocitos T-reg, células cancerosas que expresan TNFR2 o células supresoras derivadas de mieloides, así como midiendo la inhibición de la señalización de NPKB (por ejemplo, monitorizando la reducción de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB y cIAP2/BIRC3 en un ensayo de expresión génica convencional). Los ensayos de proliferación celular y los ensayos de expresión génica que se pueden usar para monitorizar la activación de TNFR2 se describen en el presente documento, por ejemplo, en los ejemplos 9 y 12, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, una "inmunoglobulina de dominio variable dual" ("DVD-Ig") se refiere a un anticuerpo que combina los dominios variables de unión a diana de dos anticuerpos monoclonales por medio de conectores para crear un agente único tetravalente de doble diana. (Gu et al., *Meth. Enzymol.*, 502:25-41, 2012). Los conectores adecuados para su uso en las cadenas ligeras de los DVD de la divulgación incluyen los identificados en la tabla 2.1 en la página 30 de Gu et al.: los conectores de cadena K corta ADAAP (SEQ ID NO: 118) (murino) y TVAAP (SEQ ID NO: 119) (humano); los conectores de cadena κ larga ADAAPTVSIFP (SEQ ID NO: 120) (murino) y TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 121) (humano); el conector de cadena λ corta QPKAAP (SEQ ID NO: 122) (humano); el conector de cadena λ larga QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 123) (humano); el conector GS corto GGSGG (SEQ ID NO: 124), el conector GS intermedio GGSGGGSGG (SEQ ID NO: 125) y el conector GS largo GGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 126) (todos los conectores GS son murinos y humanos). Los conectores adecuados para su uso en las cadenas pesadas de los DVD incluyen aquellos identificados en la tabla 2.1 en la página 30 de Gu y Ghayur, 2012, *Methods in Enzymology* 502:25-41: los conectores cortos AKTTAP (SEQ ID NO: 127) (murino) y ASTKGP (SEQ ID NO: 128) (humano); los conectores largos AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 129) (murino) y ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 130) (humano); el conector GS corto GGSGG (SEQ ID NO: 131), el conector GS medio GGSGGGGGG (SEQ ID NO: 132) y el conector largo GS GGSGGGGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 133) (todos los conectores GS son murinos y humanos).

Como se usa en el presente documento, el término "endógeno" describe una molécula (por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico o cofactor) que se encuentra naturalmente en un organismo particular (por ejemplo, un ser humano) o en una localización particular dentro de un organismo (por ejemplo, un órgano, un tejido o una célula, tal como una célula humana).

Como se usa en el presente documento, el término "exógeno" describe una molécula (por ejemplo, un polipéptido, ácido nucleico o cofactor) que no se encuentra naturalmente en un organismo particular (por ejemplo, un ser humano) o en una localización particular dentro de un organismo (por ejemplo, un órgano, un tejido o una célula, tal como una célula humana). Los materiales exógenos incluyen los que provienen de una fuente externa a un organismo o a materia cultivada extraída de él.

Como se usa en el presente documento, el término "región estructural" o "región FW" incluye residuos aminoácidos que son contiguos a las CDR. Los residuos de la región FW pueden estar presentes, por ejemplo, en anticuerpos humanos, anticuerpos derivados de roedores (por ejemplo, anticuerpos murinos), anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos Fab), fragmentos de anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, fragmentos scFv), dominios de anticuerpos y anticuerpos biespecíficos, entre otros.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína que se une por medio de un enlace covalente a otra molécula. Una proteína de fusión se puede sintetizar químicamente mediante, por ejemplo, una reacción de formación de un enlace amida entre el extremo N de una proteína y el extremo C de otra proteína. De forma alternativa, una proteína de fusión que contiene una proteína unida covalentemente a otra proteína que se puede expresar de forma recombinante en una célula (por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota) mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión, por ejemplo, a partir de un vector o del genoma de la célula. Una proteína de fusión puede contener una proteína que se une covalentemente a un conector, que a su vez se une covalentemente a otra molécula. Ejemplos de conectores que se pueden usar para la formación de una proteína de fusión incluyen conectores que contienen péptidos, tales como los que contienen aminoácidos naturales o no naturales. En algunos modos de realización, puede ser deseable incluir D-aminoácidos en el conector, ya que estos residuos no están presentes en proteínas naturales y, por tanto, son más resistentes a la degradación por proteasas endógenas. Los conectores se pueden preparar usando una variedad de estrategias que son bien conocidas en la técnica y, dependiendo de los componentes reactivos del conector, se pueden escindir mediante hidrólisis enzimática, fotólisis, hidrólisis en condiciones ácidas, hidrólisis en condiciones básicas, oxidación, reducción de disulfuro, escisión nucleofílica o escisión organometálica (Lerliche et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 20:571-582, 2012).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos heteroespecíficos" se refiere a anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos heteroespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein et al., *Nature* 305:537, 1983). Se divulgan procedimientos similares, por ejemplo, en el documento WO 93/08829, las patentes de EE. UU. n.º 6.210.668; 6.193.967; 6.132.992; 6.106.833; 6.060.285; 6.037.453; 6.010.902; 5.989.530; 5.959.084; 5.959.083; 5.932.448; 5.833.985; 5.821.333; 5.807.706; 5.643.759; 5.601.819; 5.582.996; 5.496.549; 4.676.980, los documentos WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trauneker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991), Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986). Los anticuerpos heteroespecíficos puede incluir mutaciones de Fc que imponen una asociación de cadena correcta en anticuerpos multiespecíficos, como se describe por Klein et al., *mAbs* 4(6):653-663, 2012.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, región estructural, dominios C_L, C_H (por ejemplo,

CH1, CH2, CH3), bisagra, (VL, VH)) es sustancialmente no inmunogénico en humanos, con solo cambios o variaciones menores en la secuencia. Un anticuerpo humano se puede producir en una célula humana (por ejemplo, mediante expresión recombinante) o por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que puede expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reordenados (por ejemplo, la cadena pesada y/o la cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo monocatenario, puede incluir un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos naturales. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, tal como de dos a aproximadamente ocho residuos de glicina u otros residuos aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos conectores son de origen humano. Los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo procedimientos de presentación en fagos usando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes de EE. UU. n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 1998/46645; WO 1998/50433; WO 1998/24893; WO 1998/16654; WO 1996/34096; WO 1996/33735; y WO 1991/10741. También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; las patentes de EE. UU. n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

Como se usa en el presente documento, el término anticuerpos "humanizados" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otros subdominios de anticuerpos de unión a diana) que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana. La totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR también pueden ser las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Los procedimientos de humanización de anticuerpos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Riechmann et al., Nature 332:323-7, 1988; las patentes de EE. UU. n.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 de Queen et al.; el documento EP239400; la publicación PCT WO 91/09967; la patente de EE. UU. n.º 5,225,539; los documentos EP592106; y EP519596.

Como se usa en el presente documento, el término "cadena lateral hidrófoba" se refiere a una cadena lateral de aminoácidos que presenta baja solubilidad en agua debido, por ejemplo, a las propiedades estéricas o electrónicas de los restos químicos presentes dentro de la cadena lateral. Los ejemplos de aminoácidos que contienen cadenas laterales hidrófobas incluyen aquellos que contienen hidrocarburos alifáticos insaturados, tales como alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina y metionina, así como aminoácidos que contienen sistemas de anillos aromáticos que son electrostáticamente neutros a pH fisiológico, tales como triptófano, fenilalanina y tirosina.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al procedimiento mediante el cual se produce.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos multiespecíficos" se refiere a anticuerpos que presentan afinidad por más de un antígeno diana. Los anticuerpos multiespecíficos pueden tener estructuras similares a moléculas de inmunoglobulina completas e incluir regiones Fc, por ejemplo regiones Fc de IgG. Dichas estructuras pueden incluir, pero sin limitarse a, IgG-Fv, IgG-(scFv)₂, DVD-Ig, (scFv)₂-(scFv)₂-Fc y (scFv)₂-Fc-(scFv)₂. En el caso de IgG-(scFv)₂, el scFv se puede unir al extremo N terminal o bien al extremo C terminal de la cadena pesada o bien de la cadena ligera. Moléculas multiespecíficas ejemplares que incluyen regiones Fc y a las que se pueden incorporar anticuerpos anti-TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se han revisado por Kontermann, 2012, mAbs 4(2):182-197, Yazaki et al., 2013, Protein Engineering, Design & Selection 26(3):187-193 y Grote et al., 2012, en Proetzel & Ebersbach (eds.), Antibody Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol. 901, capítulo 16:247-263. En algunos modos de realización, los fragmentos de anticuerpo pueden ser componentes de moléculas multiespecíficas sin regiones Fc, basadas en fragmentos de IgG o DVD o scFv. Las moléculas multiespecíficas ejemplares que carecen de regiones Fc y a las que se pueden incorporar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incluyen dímeros scFv (diacuerpos), trímeros (tricuerpos) y tetrámeros (tetracuerpos), dímeros Fab (conjugados por polipéptido adhesivo o dominios proteicos) y trímeros Fab (conjugados químicamente), se describen por Hudson y Souriau, 2003, Nature Medicine 9:129-134.

Como se usa en el presente documento, el término "célula supresora derivada de mielóide" o "MDSC" se refiere a una célula del sistema inmunitario que modula la actividad de una variedad de células efectoras y células presentadoras de antígeno, tales como linfocitos T, linfocitos NK, células dendríticas y macrófagos, entre otros. Las células supresoras derivadas de mieloides se distinguen por su perfil de expresión genética y expresan la totalidad o un subconjunto de proteínas y moléculas pequeñas seleccionadas del grupo que consiste en B7-1 (CD80), B7-H1 (PD-L1), CCR2, CD1d, CD1d1, CD2, CD31 (PECAM-1), CD43, CD44, componente del complemento C5a R1, F4/80 (EMR1), Fcγ RIII (CD16), Fcγ RII (CD32), Fcγ RIIA (CD32a), Fcγ RIIB (CD32b), Fcγ

RIIB/C (CD32b/c), Fcγ RIIC (CD32c), Fcγ RIIB (CD16b), galectina-3, GP130, Gr-1 (Ly-6G), ICAM-1 (CD54), IL-1RI, IL-4Rα, IL-6Rα, integrina α4 (CD49d), integrina αL (CD11a), integrina αM (CD11b), MCSFR, MGL1 (CD301a), MGL1/2 (CD301a/b), MGL2 (CD301b), óxido nítrico, PSGL-1 (CD162), L-selectina (CD62L), siglec-3 (CD33), receptor de transferrina (TfR), VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (KDR o Flk-1). En particular, las MDSC no expresan proteínas seleccionadas del grupo que consiste en B7-2 (CD86), B7-H4, CD11c, CD14, CD21, CD23 (FcεRII), CD34, CD35, CD40 (TNFRSF5), CD117 (c-kit), HLA-DR y Sca-1 (Ly6).

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido TNFR2 neutro" se refiere a un polipéptido (tal como un polipéptido monocatenario, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) que se une a TNFR2 y no ejerce un efecto antagonista o agonista sobre la activación de TNFR2. Por ejemplo, un polipéptido TNFR2 es un polipéptido TNFR2 neutro si el polipéptido se une a TNFR2 y no potencia ni suprime la activación de TNFR2, por ejemplo, como se evalúa midiendo la proliferación de una población de células que expresan TNFR2 (por ejemplo, linfocitos T-reg, células cancerosas TNFR2+ y/o MDSC) y/o midiendo la expresión de uno o más genes diana de NPKB, tales como CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB y/o cIAP2/BIRC3. Se describen ensayos ejemplares para medir la proliferación celular y la expresión génica, por ejemplo, en los ejemplos 9 y 12, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "región constante no natural" se refiere a una región constante de anticuerpo que se deriva de una fuente que es diferente de la región variable del anticuerpo o que es un polipéptido sintético generado por humanos que tiene una secuencia de aminoácidos que es diferente de la secuencia de la región constante del anticuerpo natural. Por ejemplo, un anticuerpo que contiene una región constante no natural puede tener una región variable derivada de una fuente no humana (por ejemplo, un ratón, rata o conejo) y una región constante derivada de una fuente humana (por ejemplo, una región constante de anticuerpo humano).

Como se usa en el presente documento, el término "porcentaje (%) de identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de residuos aminoacídicos (o de ácidos nucleicos) de una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos (o de ácidos nucleicos) de una secuencia de referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de las secuencias candidata y de referencia para una alineación óptima y se pueden descartar las secuencias no homólogas para propósitos de comparación). La alineación con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático disponible públicamente, tal como el programa informático BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, una secuencia de referencia alineada para comparación con una secuencia candidata puede mostrar que la secuencia candidata presenta de un 50 % a un 100 % de identidad de secuencia en la longitud completa de la secuencia candidata o una porción seleccionada de residuos aminoacídicos (o de ácidos nucleicos) contiguos de la secuencia candidata. La longitud de la secuencia candidata alineada para propósitos de comparación puede ser, por ejemplo, al menos un 30 %, (por ejemplo, un 30 %, 40, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %) de la longitud de la secuencia de referencia. Cuando una posición en la secuencia candidata está ocupada por el mismo residuo aminoacídico que la posición correspondiente en la secuencia de referencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones estructurales de anticuerpos derivados de primates y otras regiones, tales como CDR y regiones constantes, de anticuerpos de una fuente no primate. Se conocen en la técnica procedimientos para producir anticuerpos primatizados. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.

Como se usa en el presente documento, el término "enlazado de forma funcional" en el contexto de un fragmento de polinucleótido pretende significar que los dos fragmentos de polinucleótidos se unen de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de polinucleótidos permanecen sin cambio de pauta de lectura.

Como se usa en el presente documento, el término "perfil farmacocinético" se refiere a la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco a lo largo del tiempo después de la administración del fármaco a un paciente.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista recesivo" de TNFR2 es un antagonista (por ejemplo, un polipéptido antagonista, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) que inhibe la activación de TNFR2 en un grado significativamente menor en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNFα, o IL-2 con respecto al grado de inhibición del mismo antagonista medido en ausencia de un agonista del TNFR2, tal como TNFα, o IL-2. Por ejemplo, un antagonista del TNFR2 es un antagonista recesivo si la IC_{50} del antagonista se incrementa, por ejemplo, en 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más en presencia de un agonista del TNFR2 (por ejemplo, TNFα).

o IL-2 con respecto a la CI_{50} del antagonista medida en el mismo ensayo en ausencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α , o IL-2. La inhibición de la activación de TNFR2 se puede evaluar, por ejemplo, midiendo la inhibición de la proliferación de una población de células TNFR2+, tales como linfocitos T-reg, células cancerosas que expresan TNFR2 o células supresoras derivadas de mieloides, así como midiendo la inhibición de la señalización de NPKB (por ejemplo, monitorizando la reducción de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en CHUK, NFKBIE, NFKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB y cIAP2/BIRC3 en un ensayo de expresión génica convencional). Los ensayos de proliferación celular y los ensayos de expresión génica que se pueden usar para monitorizar la activación de TNFR2 se describen en el presente documento, por ejemplo, en los ejemplos 9 y 12, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia reguladora" incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185 (Academic Press, San Diego, CA, 1990).

Como se usa en el presente documento, el término "scFv" se refiere a un anticuerpo Fv monocatenario en el que los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo se han unido para formar una cadena. Los fragmentos scFv contienen una única cadena polipeptídica que incluye la región variable de una cadena ligera (VL) de anticuerpo (por ejemplo, CDR-L1, CDR-L2 y/o CDR-L3) y la región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo (por ejemplo, CDR-H1, CDR-H2 y/o CDR-H3) separados por un conector. El conector que une las regiones VL y VH de un fragmento scFv puede ser un conector peptídico compuesto de aminoácidos proteinógenos. Se pueden usar conectores alternativos para incrementar la resistencia del fragmento scFv a la degradación proteolítica (por ejemplo, conectores que contienen D-aminoácidos), para potenciar la solubilidad del fragmento scFv (por ejemplo, conectores hidrófilos tales como conectores que contienen polietilenglicol o polipéptidos que contienen residuos repetidos de glicina y serina), para mejorar la estabilidad biofísica de la molécula (por ejemplo, un conector que contiene residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intramoleculares o intermoleculares) o para atenuar la inmunogenicidad del fragmento scFv (por ejemplo, conectores que contienen sitios de glucosilación). Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.892.019, Flo et al. (*Gene* 77:51, 1989); Bird et al. (*Science* 242:423, 1988); Pantoliano et al. (*Biochemistry* 30:10117, 1991); Milenic et al. (*Cancer Research* 51:6363, 1991); y Takkinen et al. (*Protein Engineering* 4:837, 1991). Los dominios VL y VH de una molécula scFv se pueden derivar de una o más moléculas de anticuerpo. Un experto en la técnica también entenderá que las regiones variables de las moléculas scFv de la divulgación se pueden modificar de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de anticuerpo de la que se derivaron. Por ejemplo, en un modo de realización, se pueden preparar sustituciones aminoacídicas o de nucleótidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservadores en los residuos aminoacídicos (por ejemplo, en residuos de CDR y/o estructurales). De forma alternativa o además, se preparan mutaciones en residuos aminoacídicos de CDR para optimizar la unión a antígeno usando técnicas reconocidas en la técnica. Los fragmentos scFv se describen, por ejemplo, en el documento WO 2011/084714.

Como se usa en el presente documento, la frase "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un antígeno en una población heterogénea de proteínas y otras moléculas biológicas que se reconoce, por ejemplo, por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, con particularidad. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno se unirá al antígeno con una K_D inferior a 100 nM. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno se unirá al antígeno con una K_D de hasta 100 nM (por ejemplo, entre 1 pM y 100 nM). Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que no presenta unión específica a un antígeno particular o epítipo del mismo presentará una K_D superior a 100 nM (por ejemplo, superior a 500 nM, 1 μ M, 100 μ M, 500 μ M o 1 mM) para ese antígeno particular o epítipo del mismo. Se pueden usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína o carbohidrato particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína o un carbohidrato. Véase, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (1988) y Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (1999), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un organismo que recibe tratamiento para una enfermedad o afección particular como se describe en el presente documento (tal como cáncer o una enfermedad infecciosa). Ejemplos de sujetos y pacientes incluyen mamíferos, tales como humanos, primates, cerdos, cabras, conejos, hámsteres, gatos, perros, cobayas, miembros de la familia de los bóvidos (tales como ganado bovino, bisontes, búfalos, alces y yaks, entre otros), vacas, ovejas, caballos y bisontes, entre otros, que reciben tratamiento para enfermedades o afecciones, por ejemplo, trastornos de proliferación celular, tales como cáncer o enfermedades infecciosas.

Como se usa en el presente documento, el término "transfección" se refiere a cualquiera de una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o

eucariota, por ejemplo, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un tratamiento terapéutico, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico no deseado o trastorno, tal como la progresión de un trastorno de proliferación celular, tal como cáncer o una enfermedad infecciosa. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a padecer la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

Como se usan en el presente documento, los términos "superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral", "superfamilia de TNFR" o "TNFRS" se refieren a un grupo de proteínas transmembrana de tipo I con un dominio intracelular carboxiterminal y un dominio extracelular aminoterminal caracterizado por un dominio común rico en cisteína (CRD). La superfamilia de TNFR incluye receptores que median la señalización celular como consecuencia de la unión a uno o más ligandos de la superfamilia de TNF. La superfamilia de TNFR se puede dividir en dos subgrupos: receptores que contienen el dominio de muerte intracelular y aquellos que carecen de este dominio. El dominio de muerte es un motivo de 80 aminoácidos que propaga cascadas de transducción de señales apoptóticas después de la activación del receptor. Los miembros ejemplares de la superfamilia de TNFR que contienen el dominio de muerte intracelular incluyen TNFR1, mientras que TNFR2 representa una proteína de la superfamilia de TNFR que no contiene este dominio. Los miembros de la superfamilia de TNFR incluyen TNFR1, TNFR2, RANK, CD30, CD40, receptor de linfotóxina beta (LT- β R), OX40, receptor Fas, receptor señuelo 3 (DCR3), CD27, 4-1BB, receptor de muerte 4 (DR4), receptor de muerte 5 (DR5), receptor señuelo 1 (DCR1), receptor señuelo 2 (DCR2), osteoprotegrina, receptor TWEAK, TACI, receptor BAFF, mediador de entrada de herpesvirus, receptor del factor de crecimiento nervioso, antígeno de maduración de linfocitos B, relacionado con TNFR inducido por glucocorticoides, TROY, receptor de muerte 6 (DR6), receptor de muerte 3 (DR3) y receptor de ectodisplasina A2.

Como se usa en el presente documento, el término "CDR de región variable" incluye aminoácidos en una CDR o región determinante de complementariedad identificada usando procedimientos basados en secuencia o estructura. Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se refiere a los sitios de unión a antígeno no contiguos que se encuentran dentro de las regiones variables de polipéptidos de la cadena tanto pesada como ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616, 1977 y Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991 ; por Chothia et al. (J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987) y por MacCallum et al. (J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996) donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos aminoácidos cuando se comparan entre sí. En determinados modos de realización, el término "CDR" es una CDR como se define por Kabat en base a comparaciones de secuencias.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" incluye un vector de ácido nucleico, por ejemplo, un vector de ADN, tal como un plásmido, un vector de ARN, virus u otro replicón adecuado (por ejemplo, un vector vírico). Se han desarrollado una variedad de vectores para la administración de polinucleótidos que codifican proteínas exógenas en una célula procariota o eucariota. Ejemplos de dichos vectores de expresión se divulgan, por ejemplo, en el documento WO 1994/11026. Los vectores de expresión de la divulgación contienen una secuencia de polinucleótidos así como, por ejemplo, elementos de secuencia adicionales usados para la expresión de proteínas y/o la integración de estas secuencias de polinucleótidos en el genoma de una célula de mamífero. Determinados vectores que se pueden usar para la expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la divulgación incluyen plásmidos que contienen secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras y potenciadoras, que dirigen la transcripción génica. Otros vectores útiles para la expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contienen secuencias de polinucleótidos que potencian la tasa de traducción de estos genes o mejoran la estabilidad o exportación nuclear del ARNm que resulta de la transcripción génica. Estos elementos de secuencia incluyen, por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3', un sitio de entrada ribosómica interna (IRES) y un sitio señal de poliadenilación para dirigir la transcripción eficaz del gen transportado en el vector de expresión. Los vectores de expresión de la divulgación también pueden contener un polinucleótido que codifica un marcador para la selección de células que contienen dicho vector. Ejemplos de un marcador adecuado incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos, tales como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina o nourseotricina.

Como se usa en el presente documento, el término "VH" se refiere a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina de un anticuerpo, incluyendo la cadena pesada de un Fv, scFv o Fab. Las referencias a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la cadena ligera de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Los anticuerpos (Abs) y las inmunoglobulinas (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión por una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad por la diana. Los anticuerpos e inmunoglobulinas naturales son normalmente

glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada de un anticuerpo natural tiene en el extremo amino un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera de un anticuerpo natural tiene un dominio variable en el extremo amino (VL) y un dominio constante en el extremo carboxi.

Breve descripción de las figuras

Las **figuras 1A y 1B** muestran las secuencias de ADN y aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1. La **figura 1A** muestra la secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de TNFRAB1 (arriba) y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (abajo). Las secuencias de aminoácidos de las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se muestran en negrita. La **figura 1B** muestra la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de TNFRAB1 (arriba) y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (abajo). Las secuencias de aminoácidos de las tres CDR se muestran en negrita.

Las **figuras 2A y 2B** muestran la secuencia de aminoácidos de TNFR2 humano (SEQ ID NO: 7). En particular, el TNFR2 humano se numera en el presente documento comenzando con una metionina N terminal en la posición 1 y concluyendo con una serina C terminal en la posición 461 (SEQ ID NO: 7). Todas las referencias a posiciones de aminoácidos dentro de TNFR2 se hacen en el contexto del esquema de numeración de TNFR2 mostrado en las figuras 2A y 2B. (**Figura 2A**) Los residuos sombreados KCRPGFV (SEQ ID NO: 20) definen un epítipo que se une específicamente por el anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1. Significativamente, la capacidad de TNFRAB1 para unirse selectivamente a residuos dentro de esta región sin unirse a los residuos subrayados KCSPG (SEQ ID NO: 12) promueve el antagonismo de la señalización de TNFR2. La escasa (o ausencia de) afinidad de los anticuerpos de la invención por los residuos dentro o cerca de la región de los residuos subrayados es consecuente con la actividad antagonista de estos anticuerpos, ya que la unión a epítopos que contienen los residuos subrayados se ha correlacionado con la atenuación de la actividad inhibidora entre los anticuerpos contra TNFR2. TNFRAB1 se une adicionalmente a un epítipo que incluye los residuos sombreados CKPCAPGTF (SEQ ID NO: 21). Aunque estos residuos no son consecutivos en la secuencia primaria con el motivo KCRPG, es probable que estén espacialmente próximos en la estructura terciaria tridimensional de TNFR2 y se puedan localizar apropiadamente para la interacción con un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención (véase la figura 4). (**Figura 2B**) Los residuos sombreados CAPLRKRCR (SEQ ID NO: 11) definen un epítipo que se une específicamente por el anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB2. TNFRAB2 se puede unir adicionalmente a una o más regiones que incluyen los residuos DSTYTQL (SEQ ID NO: 8), PECLSCGS (SEQ ID NO: 9) y RICTCRPG (SEQ ID NO: 10), que pueden ser parte de un epítipo discontinuo. Aunque estos residuos no son consecutivos en la secuencia primaria, es probable que estén espacialmente próximos en la estructura terciaria tridimensional de TNFR2 y se puedan localizar apropiadamente para la interacción con un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención.

Las **figuras 3A y 3B** son tablas que muestran los datos sin procesar obtenidos de experimentos de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) que se llevaron a cabo para determinar la afinidad de TNFRAB1 y TNFRAB2 por diversos epítopos continuos y discontinuos dentro de TNFR2 (véase el ejemplo 1). Los valores de luminiscencia sin procesar se muestran en la cuarta columna de las tablas (derecha). Las secuencias peptídicas mostradas representan aquellas que contienen una porción del epítipo conformacional dentro de TNFR2 que interactúa con TNFRAB1 (**figura 3A**) o TNFRAB2 (**figura 3B**). Los residuos aminoácidos con el código de un solo dígito "2" designan residuos de cisteína fueron protegidos químicamente en la posición tiol con un resto acetamidometilo (ACM) durante la síntesis de péptidos. Estos residuos no reaccionan con los electrófilos que contienen bromometilo y, por lo tanto, no se reticularon durante las fases de ciclación y biciclación de la síntesis de péptidos. La tercera columna de las tablas indica la estructura general del andamio peptídico. "CYS.S" indica un péptido de 27 residuos en el que las posiciones 1-11 y 17-27 del péptido representan péptidos de 11 residuos derivados de TNFR2 que contienen residuos de cisteína que forman puentes disulfuro en la proteína natural en base a la información disponible para la entrada UniProt P20333. La secuencia Gly-Gly-Ser-Gly-Gly se incorporó en las posiciones 12-16 de péptidos de este grupo. Los residuos de Cys naturales que no forman puentes disulfuro se protegieron con grupos protectores acetamidometilo (ACM) y se designaron con el código de un solo dígito "2".

La **figura 4** es un esquema que ilustra los epítopos conformacionales dentro de TNFR2 que pueden interactuar con anticuerpos antagonistas del TNFR2, tales como TNFRAB1 y TNFRAB2, así como residuos que no interactúan con anticuerpos antagonistas del TNFR2. Se muestra el motivo KCSPG en la expansión en la parte superior izquierda de la figura; se muestra el motivo KCRPG en la expansión a la derecha de la figura. La superficie exterior de la proteína designa la superficie de van der Waals de TNFR2. La figura 4 es una representación de un monómero de TNFR2 aislado de la estructura cristalina de rayos X de TNFR2 (PDB ID: 3ALQ, Mukai, et al., Sci. Signal., 3:ra83, 2010).

La **figura 5** es un gráfico que muestra que TNFRAB1 suprime el crecimiento de linfocitos T-reg cultivados *in vitro*. Los valores representan la fracción de linfocitos T-reg viables con respecto a las células de control no tratadas que permanecieron en cultivo después de la exposición de las células a una condición particular. Las barras mostradas en el extremo izquierdo representan linfocitos T-reg tratados con IL-2 a 200 U/ml (control), TNFα (20 ng/ml), anticuerpo agonista del TNFR2 (2,5 µg/ml), anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1 (2,5 µg/ml) o anticuerpo

antagonista del TNFR2 TNFRAB2 (2,5 µg/ml). Las barras mostradas en segundo lugar desde la izquierda demuestran la variación dependiente de la dosis en la viabilidad de T-reg tras el tratamiento de células con TNFRAB1. Las barras mostradas en segundo lugar desde la derecha muestran la capacidad de TNFRAB1 para inhibir la actividad promotora del crecimiento del TNFα. Los linfocitos T-reg se trataron con una concentración constante de TNFα (20 ng/ml) y concentraciones variables de TNFRAB1 (de 0,0008 a 25 µg/ml). TNFRAB1 pudo suprimir la proliferación inducida por TNFα de una manera dependiente de la concentración, lo que indica que TNFRAB1 antagoniza TNFR2. Las barras mostradas en el extremo derecho demuestran el efecto del TNFα sobre el crecimiento de linfocitos T-reg. La incubación de linfocitos T-reg con 20 ng/ml de TNFα dio como resultado aproximadamente un 130 % de proliferación con respecto a las células no tratadas.

La **figura 6A** es un gráfico que muestra la capacidad del TNFα para inducir la proliferación de linfocitos aT-reg de una manera dependiente de la dosis. La **figura 6B** es un gráfico que muestra la capacidad de IL-2 para inducir la proliferación de linfocitos aT-reg de una manera dependiente de la dosis. La incubación de células CD4+ humanas recién aisladas durante hasta 48 horas con TNFα e IL-2 (200 U/ml) induce la expansión de linfocitos T-reg de una manera dependiente de la dosis y la presencia de IL-2 es importante para promover la expansión de T-reg. La **figura 6C** es un gráfico que muestra el efecto del TNFα y los anticuerpos antagonistas del TNFR2 dominantes TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg. Los valores en el eje de abscisas representan el cambio porcentual en la cantidad de linfocitos T-reg con respecto a una muestra tratada con IL-2. Las **figuras 6D y 6E** son gráficos que muestran los resultados de experimentos duplicados llevados a cabo para determinar el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg. Las figuras 6F y 6G son gráficos que muestran los resultados de experimentos duplicados llevados a cabo para determinar el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg.

La **figura 7A** es un gráfico que muestra el efecto de TNFα sobre la proliferación de linfocitos T-reg CD4+. Los valores en el eje de abscisas indican el cambio porcentual en la cantidad de linfocitos T-reg tras el tratamiento con TNFα con respecto al tratamiento con IL-2. La **figura 7B** es un gráfico que muestra la capacidad de TNFRAB1 para inhibir de forma dominante la proliferación de linfocitos T-reg en presencia y ausencia de TNFα. La **figura 7C** es un gráfico que muestra la capacidad de TNFRAB2 deparar inhibir la proliferación de linfocitos T-reg en presencia y ausencia de TNFα. Las **figuras 7D y 7E** son gráficos que muestran el efecto de antagonistas dominantes de TNFR2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg en presencia y ausencia de TNFα.

La **figura 8A** es un gráfico que muestra la capacidad de TNFRAB1 y TNFRAB2 para inhibir la proliferación de linfocitos T-reg en general. La **figura 8B** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg con respecto al efecto inducido por el tratamiento con IL-2. La **figura 8C** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre la cantidad total de T-reg. La **figura 8D** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre la cantidad total de T-reg con respecto al efecto inducido por el tratamiento con IL-2. La **figura 8E** es un gráfico que demuestra el efecto de TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre linfocitos T-reg activados (linfocitos aT-reg) que expresan CD25 en un estado de alta afinidad (CD25^{Hi}) y CD45RA en un estado de baja afinidad (CD45RA^{Low}). La **figura 8F** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 y TNFRAB2 sobre una población de linfocitos T-reg que expresan CD45RO^{Hi} y CD25^{Hi}. La **figura 8G** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre linfocitos T CD4+ que expresan CD25^{Hi}. La **figura 8H** es un gráfico que demuestra el efecto de TNFRAB2 sobre linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi}. Estos datos demuestran que, mientras que la proliferación de células tanto activadas (aT-reg) como en reposo (rT-reg) se inhibe tras el tratamiento con TNFRAB1 o TNFRAB2, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 inhiben preferentemente la proliferación de linfocitos aT-reg.

La **figura 9A** es una serie de gráficos de citometría de flujo bidimensionales que demuestran el efecto de agentes que dirigen el crecimiento de linfocitos T-reg (por ejemplo, TNFα, IL-2 y agonistas del TNFR2), así como un antagonista del TNFR2, TNFRAB2, sobre la proliferación de linfocitos T-reg de diversos fenotipos. El tratamiento con un anticuerpo antagonista del TNFR2 inhibe preferentemente la proliferación de linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi}. Se muestra la proporción de células CD4+, CD25^{Hi} que expresan TNFR2 después de hasta 48 horas de incubación con IL-2 (200 U/ml) sola, con TNFα (20 ng/ml) o bien con anticuerpos antagonistas del TNFR2 (12,5 µg/ml). La **figura 9B** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la secreción de TNFR2, mostrado en unidades de pg/ml. La **figura 9C** es una serie de gráficos de citometría de flujo unidimensionales que muestran el efecto de TNFRAB2 sobre el recuento de linfocitos T CD8+ medido mediante marcado con carboxifluoresceína (CFSE).

La **figura 10A** es un gráfico que muestra la capacidad del TNFRAB1 (IgG) de longitud completa, así como del fragmento F(ab')₂ de TNFRAB1, para inhibir la proliferación de linfocitos T-reg. La **figura 10B** es un gráfico que muestra la capacidad del TNFRAB2 (IgG) de longitud completa, así como del fragmento F(ab')₂ de TNFRAB2, para inhibir la proliferación de linfocitos T-reg. Estos datos demuestran que la unión específica de las regiones Fab de estos anticuerpos antagonistas del TNFR2 a TNFR2 es probablemente responsable de modular el crecimiento de linfocitos T-reg, en lugar de la unión no específica de las regiones Fc de estos anticuerpos. La incubación de células CD4+ recién aisladas durante hasta 48 h con IL-2 (200 U/ml) más el anticuerpo completo o el fragmento F(ab')₂ de TNFRAB1 o bien de TNFRAB2 produce una inhibición de linfocitos T-reg dependiente de la dosis similar en presencia o ausencia de TNFα (20 ng/ml). La **figura 10C** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo

de dosis-respuesta en el que se trataron linfocitos T-reg con TNFRAB1 en presencia de anticuerpos anti-IgG. La **figura 10D** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de dosis-respuesta en el que se trataron linfocitos T-reg con TNFRAB2 en presencia de anticuerpos anti-IgG. La supresión dependiente de la dosis del crecimiento de linfocitos T-reg inducida por anticuerpos antagonistas del TNFR2 no se vio afectada por la presencia de moléculas anti-IgG, lo que indica que la reticulación no específica mediado por TNFRAB1 o TNFRAB2 no es responsable del efecto inhibitorio de estos anticuerpos sobre la proliferación de linfocitos T-reg. La coincubación de anticuerpos reticulantes (2,5 µg/ml) con anticuerpos antagonistas del TNFR2 (0,02-25 µg/ml) no afecta la capacidad de los anticuerpos para inhibir la proliferación de T-reg de una manera dependiente de la dosis. Los datos se presentan como un único ejemplo representativo.

La **figura 11A** es una imagen de un gel de poli(acrilamida) que muestra los resultados del análisis SDS-PAGE llevado a cabo tras la expresión de TNFRAB1. La **figura 11B** es una imagen de un gel de poli(acrilamida) que muestra los resultados del análisis SDS-PAGE llevado a cabo tras la expresión de TNFRAB2. Se muestra el análisis de anticuerpos antagonistas del TNFR2 reducidos y no reducidos (2,5 µg). La **figura 11C** es una imagen de un gel de poli(acrilamida) que muestra los resultados del análisis SDS-PAGE llevado a cabo tras la expresión de fragmentos F(ab')₂ de TNFRAB1. La **figura 11D** es una imagen de un gel de poli(acrilamida) que muestra los resultados del análisis SDS-PAGE llevado a cabo tras la expresión de fragmentos F(ab')₂ de TNFRAB2. Se muestra el análisis de anticuerpos antagonistas del TNFR2 antes y después de la digestión en la preparación del fragmento F(ab')₂.

La **figura 12A** es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpos antagonistas del TNFR2 sobre la expresión de TNFα y linfotóxina. La **figura 12B** es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpos antagonistas del TNFR2 sobre la expresión de FoxP3 y CD25. La **figura 12C** es un gráfico que muestra el efecto de anticuerpos antagonistas del TNFR2 sobre la expresión de genes que promueven la activación de NPKB: cinasa ubiquina de hélice-bucle-hélice conservada (CHUK), inhibidor ε del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en linfocitos B (NFKBIE), inhibidor alfa del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido de cadena ligera kappa en linfocitos B (NFKBIA), proteína cinasa 11 activada por mitógenos (MAP3K11), factor 2 asociado al receptor de TNFα (TRAF2), factor 3 asociado al receptor de TNFα (TRAF3), factor de transcripción RelB y repetición de IAP de baculovirus que contiene la proteína 3 (cIAP2/BIRC3). Se usó análisis de PCR en tiempo real para detectar ARN aislado de células CD4⁺ recientes después de la incubación con IL-2 (50 U/ml) en combinación con TNFα (20 ng/ml) o bien con el antagonista del TNFR2 (2,5 µg/ml) durante 3 horas. La **figura 12D** es un gráfico que muestra la capacidad de TNFRAB1 para suprimir la activación de NFκB medida usando un ensayo ELISA basado en células. La **figura 12E** es un gráfico que muestra la capacidad de TNFRAB2 para suprimir la activación de NPKB medida usando un ensayo ELISA basado en células. Se usó RelA/NFκB p65 fosforilada como marcador de la actividad de NPKB. El tratamiento de linfocitos T-reg con anticuerpos antagonistas del TNFR2 dio como resultado una activación atenuada de NPKB con respecto al tratamiento con TNFα. Usando un ELISA basado en células, se midió la fosforilación de Rel/NFκB p65 después de 10 minutos de incubación de células CD4⁺ recientes con IL-2 (200 U/ml) y diversas concentraciones de TNFα (0,2-20 ng/ml) o anticuerpos antagonistas del TNFR2 (0,02-25 µg/ml). La fosforilación de RelA/NFκB p65 es inducida por TNFα e inhibida por los mAb antagonistas del TNFR2 de manera dependiente de la dosis.

La **figura 13A** es una tabla que muestra los parámetros cinéticos y termodinámicos de la unión de TNFRAB1 y TNFRAB2 a TNFR2. Las constantes de velocidad de asociación se muestran en unidades de M⁻¹s⁻¹, las constantes de velocidad de disociación se muestran en unidades de s⁻¹ y las constantes de equilibrio se muestran en unidades de M. La **figura 13B** es una tabla que muestra la afinidad de TNFRAB1 y TNFRAB2 por diversas secuencias peptídicas lineales dentro del TNFR2 humano. La afinidad relativa se indica como una serie de símbolos "+", de modo que cantidades mayores de este símbolo representan valores de afinidad elevados. Se proporcionan datos sin procesar derivados de experimentos de unión ELISA en la columna "Lectura". La **figura 13C** es una tabla que muestra el efecto del TNFα sobre la afinidad de TNFRAB1 y TNFRAB2 por diversas secuencias peptídicas lineales dentro del TNFR2 humano. La afinidad relativa se indica como una serie de símbolos "+", de modo que cantidades mayores de este símbolo representan valores de afinidad elevados. Se proporcionan datos sin procesar derivados de experimentos de unión ELISA en la columna "Lectura".

Las **figuras 14A y 14B** son gráficos que muestran los resultados de experimentos duplicados llevados a cabo para determinar el efecto de un anticuerpo antagonista del TNFR2 recesivo que inhibe levemente la actividad de TNFR2 (anticuerpo A antagonista del TNFR2 recesivo) sobre la proliferación de linfocitos T-reg. Las **figuras 14C y 14D** son gráficos que muestran los resultados de experimentos duplicados llevados a cabo para determinar el efecto de un segundo antagonista del TNFR2 recesivo que inhibe levemente la actividad de TNFR2 (anticuerpo B antagonista del TNFR2 recesivo) sobre la proliferación de linfocitos T-reg. Estos anticuerpos antagonistas recesivos se generaron contra la región exterior de TNFR2 para evitar la trimerización de TNFR2 que da lugar a la activación de NPKB.

La **figura 15A** es un modelo estructural que muestra una estructura tridimensional del dímero antiparalelo y del dímero paralelo del TNFR2 humano. La **figura 15B** es un modelo estructural que muestra la estructura tridimensional del complejo TNFα-TNFR2. Los residuos sombreados representan aminoácidos dentro del TNFR2 humano que se unen por TNFRAB1. Las proteínas se representan en forma de cinta debajo de una superficie de

Van der Waals. Los datos descritos en el presente documento muestran claramente que, para que el anticuerpo completo o el fragmento F(ab')₂ del mismo se una a un TNFR2 en una conformación antiparalela, el receptor TNFR2 se uniría al anticuerpo o fragmento del mismo en los motivos de aminoácidos indicados. Los sitios de unión del dímero paralelo están demasiado cerca entre sí y, por tanto, impedirían la unión del anticuerpo. Además, el complejo trimérico TNFα-TNFR2 enmascara los epítomos unidos por anticuerpos antagonistas del TNFR2, ya que estos residuos se localizan en el interior de la estructura trimérica. La **figura 15C** es una imagen que muestra el modelo estructural trimérico conocido y publicado de TNFR2 como un trímero con TNF trímero contenido. En esta estructura también se muestran residuos sombreados que representan aminoácidos dentro del TNFR2 humano que se unen por los anticuerpos A y B antagonistas del TNFR2 recesivos.

La **figura 16A** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un paciente que presenta cáncer de ovario (sombreado gris) y de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario (sombreado negro). La **figura 16B** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un paciente que presenta cáncer de ovario (sombreado gris) y de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario (sombreado negro).

La **figura 17A** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario. La **figura 17B** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario. La **figura 17C** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que presenta cáncer de ovario. La **figura 17D** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que presenta cáncer de ovario. La **figura 17E** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario (conjunto de datos duplicados con respecto a la figura 17A). La **figura 17F** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que no presenta cáncer de ovario (conjunto de datos duplicados con respecto a la figura 17B). La **figura 17G** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB1 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que presenta cáncer de ovario (conjunto de datos duplicados con respecto a la figura 17C). La **figura 17H** es un gráfico que muestra el efecto de TNFRAB2 sobre la proliferación de linfocitos T-reg aislados de un sujeto que presenta cáncer de ovario (conjunto de datos duplicados con respecto a la figura 17D).

La **figura 18A** es un modelo estructural de un miembro de la TNFRS, el receptor 3 de muerte (DR3) humano, mostrado en una conformación de dímero antiparalelo. Los cuatro dominios ricos en cisteína de DR3 se indican con números romanos I-IV. El modelo estructural es una reproducción de Tengchuan, copia de archivo original de la tesis, Structural Characterization of TNF Receptors and Ligands, Chicago, IL, 2008. La **figura 18B** es un modelo estructural que muestra TNFR1 en una conformación de dímero antiparalelo. En este modelo, el extremo N de un monómero de TNFR1 se localiza cerca del centro del otro monómero de TNFR1. La **figura 18C** es un modelo estructural que muestra TNFR1 en una conformación de dímero antiparalelo alternativa. En este modelo, los extremos N de los monómeros de TNFR1 y los extremos C de los monómeros de TNFR1 se localizan próximos entre sí. Las figuras 18B y 18C son reproducciones de Naismith et al. Structure 4:1251-1262 (1996).

Descripción detallada

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención inhiben la activación de TNFR2 en células que expresan TNFR2 uniéndose a este receptor (por ejemplo, en la superficie exterior de un linfocito T-reg, una célula cancerosa que expresa TNFR2 o una célula supresora derivada de mieloides (MDSC) y evitan por tanto que la proteína reclute su ligando afín, TNFα. TNFα potencia la señalización de TNFR2 mediante nucleación de un trímero de proteínas TNFR2. Es este acontecimiento de trimerización el que pone las proteínas TNFR2 individuales en estrecha proximidad e inicia la señalización a través de la vía MAPK/NFκB/IRAK2/3, lo que en última instancia da lugar a crecimiento celular y a resistencia a la apoptosis. Los polipéptidos de unión a TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) pueden antagonizar esta interacción uniéndose al receptor y evitando que el TNFα desencadene este cambio estructural. Por ejemplo, un mecanismo por el cual esto puede ocurrir es a través de la formación de un dímero de TNFR2 antiparalelo, que es una forma estructural inactiva del receptor.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden usar para inhibir la actividad de otros miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRS). Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden unir a un miembro de la TNFRS, tal como DR3 o TNFR1, en una conformación de dímero antiparalelo. Al unirse a un miembro de la TNFRS en una estructura de dímero antiparalelo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos forman un complejo con el miembro de la TNFRS en el que los residuos del receptor que se unen a un ligando afín, tal como TNFα en el caso de TNFR2, quedan capturados dentro del interior del complejo. Por tanto, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden evitar la trimerización mediada por ligando y, por lo tanto, la activación de un miembro de la TNFRS formando un complejo con el miembro de la TNFRS que impide estéricamente que el ligando endógeno acceda a sus sitios de unión afines dentro del receptor. Los miembros de la TNFRS ejemplares que son conocidos

por adoptar una conformación de dímero antiparalelo incluyen TNFR1, TNFR2, Fas, DCR3, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, DR6, EDAR, CD271, OPG, RANK, LT β R, TWEAK-R, HVEM, CD27, CD30, CD40, CD137, OX40, GITR, BCMA, TACI, BAFFR, EDAR2, TROY y RELT, entre otros. Por lo tanto, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden usar para unirse a un miembro de la TNFRS, tal como TNFR2, en una conformación de dímero antiparalelo para inhibir la actividad del miembro de la TNFRS en una célula diana, tal como un linfocito T-reg, una célula cancerosa TNFR2+ o una célula supresora derivada de mielóide. Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden unir a DR3 en una conformación de dímero antiparalelo (por ejemplo, como se muestra en la figura 18A) y/o a TNFR1 en una conformación de dímero antiparalelo (por ejemplo, como se muestra en la figura 18B). Los polipéptidos antagonistas (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden unir a miembros de la TNFRS tales como DR3 y/o TNFR1 en una conformación antiparalela como se muestra en las figuras 18A y 18B, haciendo por tanto que los sitios de unión de ligandos afines sean estéricamente inaccesibles y atenuando de la señalización mediada por miembros de la TNFRS. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas de DR3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden unir a un epítipo dentro de los residuos 138-150 de la secuencia de aminoácidos de DR3 (n.º de acceso a GENBANK™ AAQ88676.1). Los anticuerpos antagonistas de TNFR1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden unir a un epítipo dentro de los residuos 185-197 de la secuencia de aminoácidos de TNFR1 (n.º de acceso a GENBANK™ NP_001056).

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden ser antagonistas dominantes (por ejemplo, polipéptidos antagonistas del TNFR2 dominantes, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos). Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 dominantes son aquellos que se pueden unir a TNFR2 (por ejemplo, en una conformación de dímero antiparalelo) e inhibir la transducción de señales mediada por TNFR2 incluso en presencia de un agonista, tal como TNF α o IL-2. Por ejemplo, en presencia de un agonista del TNFR2, un polipéptido antagonista del TNFR2 dominante puede inhibir la proliferación de una población de células, tales como linfocitos T-reg, células cancerosas que expresan TNFR2 o células supresoras derivadas de mielóide en, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más, con respecto a una población de dichas células que no se trata con un polipéptido antagonista del TNFR2 dominante. Por el contrario, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 recesivos se pueden unir a TNFR2 e inhibir la señalización mediada por TNFR2, pero la capacidad de estos polipéptidos para hacerlo se atenúa en presencia de un agonista del TNFR2. Por ejemplo, la CI₅₀ de un polipéptido antagonista del TNFR2 recesivo medida en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α , o IL-2, en un ensayo de muerte de linfocitos T-reg, un ensayo de muerte de células cancerosas TNFR2+ o un ensayo de muerte de células supresoras derivadas de mieloides puede aumentar, por ejemplo, en un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más, con respecto a la de un polipéptido antagonista del TNFR2 dominante. En el presente documento se describen ejemplos de ensayos de muerte celular que se pueden usar para medir los efectos antagonistas de los anticuerpos contra TNFR2, por ejemplo, en el ejemplo 9 a continuación. Por lo tanto, se pueden usar polipéptidos antagonistas del TNFR2 dominantes, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención para suprimir la proliferación de una célula que expresa TNFR2 (por ejemplo, un linfocito T-reg, una célula cancerosa TNFR2+, tal como una célula de cáncer de ovario, o una célula supresora derivada de mielóide) incluso en presencia de una señal inductora de crecimiento, tal como TNF α o IL-2.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden usar para atenuar la actividad (por ejemplo, proliferación) de linfocitos T-reg que típicamente acompaña a la citotoxicidad mediada por linfocitos T contra células propias, tal como el ataque de una célula tumoral por un linfocito T. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 se pueden administrar a un sujeto mamífero, tal como un ser humano (por ejemplo, mediante cualquiera de varias vías de administración descritas en el presente documento) para prolongar la duración de una respuesta inmunitaria adaptativa, tal como una respuesta contra una célula cancerosa o un organismo patógeno. De esta manera, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden crear sinergia con técnicas existentes para potenciar el tratamiento basado en linfocitos T para el cáncer y para enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden administrar para suprimir la actividad de los linfocitos T-reg, potenciando de este modo el efecto citotóxico de los linfocitos T reactivos a tumores. Los antagonistas del TNFR2 también pueden actuar sinérgicamente con estrategias existentes para promover la supervivencia de linfocitos T reactivos a tumores, tal como el tratamiento de linfodepleción y factor de crecimiento, y a su vez prolongar la duración de la reactividad antitumoral *in vivo*. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) también se pueden usar para tratar una amplia gama de enfermedades infecciosas en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano), ya que la inhibición del crecimiento de T-reg y la proliferación promueve la actividad de linfocitos T CD8+ que pueden atacar a organismos patógenos. Adicionalmente, los polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención se pueden usar para tratar una amplia variedad de enfermedades infecciosas, tales

como *Mycobacterium tuberculosis*, en un animal de granja (por ejemplo, un mamífero bovino, cerdo, vaca, caballo, oveja, cabra, gato, perro, conejo, hámster, cobaya u otro mamífero no humano).

Polipéptidos antagonistas miembros de la TNFRS

Las proteínas miembros de la TNFRS presentan propiedades conformacionales tipificadas por TNFR2. Por ejemplo, se sabe que estos receptores adoptan una conformación de dímero antiparalelo y se activan tras la trimerización inducida por la unión a un ligando afín. Las secuencias de aminoácidos y las estructuras tridimensionales de las proteínas miembros de la TNFRS son conocidas en la técnica. Por ejemplo, estudios estructurales de receptores de TNF α sin ligando han revelado que estas proteínas adoptan una conformación de dímero antiparalelo, como se describe, por ejemplo, en Naismith et al. J. Biol. Chem. 290:13303 (1995). Adicionalmente, se ha demostrado que el receptor de muerte 3 (DR3) humano adopta una conformación de dímero antiparalelo (Tengchuan, copia de archivo original de la tesis, Structural Characterization of TNF Receptors and Ligands, Chicago, IL, 2008). De forma similar, se sabe que el receptor TRAIL forma un dímero antiparalelo (Shirley et al. Rec. Pat. Anticanc. Drug Disc. 6:311 (2011)). Adicionalmente, se ha demostrado que TRAF6 adopta esta conformación estructural (Marienfeld et al. Mol. Cell. Biol. 26:9209 (2006); Yin et al. Biochem. 48:10558 (2009); y Yin et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 16:658 (2009)). Se ha demostrado que el NGFR adopta una conformación de dímero antiparalelo (Bibel et al. Genes Dev. 14:2919 (2000)). Adicionalmente, se sabe que CD40 presenta este motivo estructural (Smulski et al. J. Biol. Chem. 288:10914 (2013)). Adicionalmente, se ha demostrado que CD137 existe en un estado de dímero antiparalelo (Vinay et al. CD137 Pathway: Immunology and Diseases, Nueva York, NY, 2006). Adicionalmente, se ha demostrado que FAS, CD40, OX40 y CD27 adoptan una conformación de dímero antiparalelo (Tartaglia et al. J. Biol. Chem. 267:4304 (1992)). También se ha descubierto que BAFF-R presenta este motivo estructural (Kim et al., Nat. Struct. Biol. 10:342 (2003)).

Polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) que se unen a secuencias de aminoácidos dentro de una proteína miembro de la TNFRS que comparten secuencia u homología estructural con uno o más de los motivos KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20), CKPCAPGTF (SEQ ID NO: 21), CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11), DSTYTQL (SEQ ID NO: 8), PECLSCGS (SEQ ID NO: 9) o RICTCRPG (SEQ ID NO: 10) dentro del TNFR2 humano se pueden unir a y estabilizar la proteína miembro de la TNFRS en una conformación de dímero antiparalelo. Por ejemplo, se pueden identificar epítomos dentro de una proteína miembro de la TNFRS que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con una de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente dentro del TNFR2 humano usando técnicas de alineación de secuencias de proteínas convencionales conocidas en la técnica. A continuación, se pueden desarrollar polipéptidos antagonistas miembros de la TNFRS que se unen a uno o más de estos epítomos homólogos usando una variedad de técnicas de cribado de colecciones y de presentación *in vitro* como se describe en el presente documento (por ejemplo, véase el ejemplo 15 a continuación). Los polipéptidos antagonistas miembros de la TNFRS (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) desarrollados de esta manera se pueden unir a la proteína miembro de la TNFRS en una conformación de dímero antiparalelo, haciendo de este modo que los sitios de unión de ligandos afines sean estéricamente inaccesibles y, por tanto, imposibilitando la trimerización y activación. En particular, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un miembro de la TNFRS y estabilizan una confirmación de dímero antiparalelo tienen especificidad de unión por solo un único miembro de la TNFRS y no reaccionan de forma cruzada con otros miembros de la TNFRS.

Polipéptidos antagonistas del TNFR2

Los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden interactuar con e inhibir la actividad de TNFR2. Por tanto, los anticuerpos anti-TNFR2 de la invención pueden antagonizar selectivamente la interacción TNF α -TNFR2 en lugar de promover la señalización de TNFR2. Esto es en particular importante para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, inmunoterapia contra el cáncer, ya que la activación de TNFR2 tras la asociación con TNF α da lugar a la propagación de la cascada de señalización de MAPK y TRAF2/3 y a la activación de la transcripción mediada por NF κ B de genes implicados en el crecimiento y la resistencia a la apoptosis de linfocitos T-reg (Faustman, et al., Nat. Rev. Drug Disc., 9:482-493, 2010). Los polipéptidos anti-TNFR2 de la invención se pueden unir a TNFR2 con alta afinidad y pueden capturar estéricamente el receptor de TNF α en lugar de permitir que la unión de TNF α a TNFR2 inicie la señalización de TNFR2, por ejemplo, uniendo a TNFR2 en una conformación de dímero antiparalelo en la que los sitios de unión a TNF α sean estéricamente inaccesibles. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se pueden usar para suprimir el crecimiento y proliferación de linfocitos T-reg y se pueden administrar a un sujeto mamífero, tal como un paciente humano con un trastorno de proliferación celular o una enfermedad infecciosa, para potenciar la eficacia de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria contra células cancerosas u organismos patógenos) en el paciente.

Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir adicionalmente e inactivar TNFR2 en la superficie de una célula cancerosa, tal como una célula tumoral. Por ejemplo, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a

antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 descritos en el presente documento se pueden unir a TNFR2 en la superficie de una célula de linfoma hodgkiniano o cutáneo no hodgkiniano, célula de linfoma de linfocitos T, célula de cáncer de ovario, célula de cáncer de colon, célula de mieloma múltiple o célula de carcinoma de células renales, entre otras. La capacidad de los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención para unirse a TNFR2 directamente en una célula cancerosa proporciona otra vía mediante la cual estas moléculas pueden atenuar la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Por ejemplo, un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo antagonista del TNFR2 de la invención, tal como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que contiene una o más de las CDR de la cadena pesada y/o la cadena ligera de TNFRAB1 o TNFRAB2 a una CDR de la cadena pesada y/o la cadena ligera de TNFRAB1 o TNFRAB2, se puede unir a TNFR2 directamente en la superficie de una célula cancerosa (por ejemplo, una célula de linfoma de linfocitos T cutáneo, célula de cáncer de ovario, célula de cáncer de colon o célula de mieloma múltiple, tal como una célula de cáncer de ovario) para disminuir la capacidad de la célula para proliferar.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden demostrar la capacidad de atenuar la proliferación de linfocitos T-reg y/o células cancerosas incluso en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α o un anticuerpo agonista del TNFR2, o moléculas promotoras de crecimiento, tal como IL-2. Sin estar limitado por el mecanismo, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden presentar esta propiedad debido a la capacidad de estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para unirse a TNFR2 y estabilizar la conformación dimerica de dímero antiparalelo de este receptor. Esta configuración estructural no puede potenciar la señalización de NPKB. Al mantener el TNFR2 en un estado estructural inactivo, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden evitar que los agonistas del TNFR2 restablezcan el crecimiento celular.

Otra propiedad que pueden presentar los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) es la capacidad de no solo reducir la proliferación de linfocitos T-reg, células cancerosas TNFR2+ y/o MDSC, sino también de reducir la cantidad total de linfocitos T-reg, células cancerosas TNFR2+ y/o MDSC dentro de una muestra (por ejemplo, dentro de un paciente, tal como un paciente humano). Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden ser capaces de reducir la cantidad total de linfocitos T-reg, células cancerosas (tales como células de linfoma de linfocitos T cutáneo, células de cáncer de ovario, células de cáncer de colon, células de carcinoma de células renales o células de mieloma múltiple, entre otras) y/o MDSC en una muestra tratada con un polipéptido antagonista del TNFR2 (tal como una muestra aislada de un paciente humano sometido a tratamiento para un cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento) en, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más, con respecto a una muestra no tratada con un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La capacidad de los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención para atenuar el crecimiento de linfocitos T-reg y/o cancerosas se puede deber a la capacidad de estos polipéptidos para disminuir la cantidad de TNFR2 soluble dentro de una muestra (por ejemplo, una muestra aislada de un paciente humano sometido a tratamiento para un cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento). El TNFR2 soluble puede ser secretado, por ejemplo, por linfocitos T-reg y puede interferir con la capacidad de los antagonistas del TNFR2 para localizar el TNFR2 en la superficie de un linfocito T-reg, célula cancerosa TNFR2+ o MDSC uniéndose y capturando dichos antagonistas en el entorno extracelular. Al reducir la secreción de TNFR2, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden hacer que los linfocitos T-reg, células cancerosas TNFR2+ y/o MDSC sean cada vez más susceptibles a moléculas terapéuticas, tales como un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o agentes antineoplásicos adicionales descritos en el presente documento o conocidos en la técnica que se pueden usar junto con las composiciones y procedimientos de la invención.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden ser capaces de inhibir la proliferación o reducir la cantidad total de una población de linfocitos T-reg en una muestra (por ejemplo, una muestra aislada de un paciente humano sometido a tratamiento para un cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento) y puede actuar selectivamente sobre los linfocitos T-reg en un estado de división activa. Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden dirigir selectivamente a linfocitos T-reg activas que expresan CD25^{Hi} y CD45RA^{Low}, por ejemplo, con respecto a linfocitos T-reg en reposo que expresan CD25^{Med} y CD45RA^{Hi}. Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden ser capaces de reducir la proliferación de una población de linfocitos T-reg que expresan CD25^{Hi} y CD45RA^{Low} en, por ejemplo, un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % o más con respecto a

una población de linfocitos T-reg que no expresan las proteínas CD25^{Hi} y CD45RA^{Low}, tal como una población de linfocitos T-reg que expresa las proteínas CD25^{Med} y CD45RA^{Hi}.

Los anticuerpos antagonistas de TNFR2 de la invención pueden inhibir, por ejemplo, el crecimiento de T-reg, células cancerosas y/o MDSC con una potencia similar a la presentada por los fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos. Por ejemplo, la eliminación de la región Fc de un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención puede no alterar la capacidad de la molécula para atenuar la proliferación o reducir la cantidad total de linfocitos T-reg y/o células cancerosas en una muestra (por ejemplo, una muestra aislada de un paciente humano sometido a tratamiento para un cáncer o una enfermedad infecciosa como se describe en el presente documento). Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden funcionar mediante una vía distinta de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en la que se requiere una región Fc para reclutar proteínas efectoras para inducir la muerte celular. Adicionalmente, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden no ser susceptibles a una pérdida de capacidad inhibidora en presencia de agentes reticulantes. Por lo tanto, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden presentar actividad terapéutica en una variedad de isotipos, tales como IgG, IgA, IgM, IgD o IgE, o en una variedad de formas, tales como un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo policlonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo primatizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un dominio de inmunoglobulina variable dual, un anticuerpo monovalente o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un diacuerpo, un triacuerpo, un nanocuerpo, un andamio proteico similar a un anticuerpo, un anticuerpo de dominio, un fragmento Fv, un fragmento Fab, una molécula F(ab')₂ y un scFv en tándem (taFv).

Propiedades de unión específica de polipéptidos antagonistas del TNFR2

La unión específica de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención al TNFR2 humano se puede determinar mediante cualquiera de una variedad de procedimientos establecidos. La afinidad se puede representar cuantitativamente mediante diversas mediciones, incluyendo la concentración de anticuerpo necesaria para lograr la mitad de la inhibición máxima de la interacción TNF α -TNFR2 *in vitro* (CI₅₀) y la constante de equilibrio (K_D) de la disociación del complejo polipéptido-TNFR2. La constante de equilibrio, K_D, que describe la interacción de TNFR2 con un polipéptido de la invención es la constante de equilibrio químico para la reacción de disociación de un complejo TNFR2-anticuerpo en moléculas de TNFR2 y de anticuerpo separadas por disolvente que no interactúan entre sí.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención incluyen aquellos que se unen específicamente a TNFR2 con un valor de K_D inferior a 100 nM (por ejemplo, 95 nM, 90 nM, 85 nM, 80 nM, 75 nM, 70 nM, 65 nM, 60 nM, 55 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM). En algunos modos de realización, los anticuerpos de la invención son aquellos que se unen específicamente a TNFR2 con un valor de K_D inferior a 1 nM (por ejemplo, 990 pM, 980 pM, 970 pM, 960 pM, 950 pM, 940 pM, 930 pM, 920 pM, 910 pM, 900 pM, 890 pM, 880 pM, 870 pM, 860 pM, 850 pM, 840 pM, 830 pM, 820 pM, 810 pM, 800 pM, 790 pM, 780 pM, 770 pM, 760 pM, 750 pM, 740 pM, 730 pM, 720 pM, 710 pM, 700 pM, 690 pM, 680 pM, 670 pM, 660 pM, 650 pM, 640 pM, 630 pM, 620 pM, 610 pM, 600 pM, 590 pM, 580 pM, 570 pM, 560 pM, 550 pM, 540 pM, 530 pM, 520 pM, 510 pM, 500 pM, 490 pM, 480 pM, 470 pM, 460 pM, 450 pM, 440 pM, 430 pM, 420 pM, 410 pM, 400 pM, 390 pM, 380 pM, 370 pM, 360 pM, 350 pM, 340 pM, 330 pM, 320 pM, 310 pM, 300 pM, 290 pM, 280 pM, 270 pM, 260 pM, 250 pM, 240 pM, 230 pM, 220 pM, 210 pM, 200 pM, 190 pM, 180 pM, 170 pM, 160 pM, 150 pM, 140 pM, 130 pM, 120 pM, 110 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o 1 pM).

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención también se pueden caracterizar mediante una variedad de ensayos de unión *in vitro*. Ejemplos de experimentos que se pueden usar para determinar la K_D o la CI₅₀ de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo contra TNFR2 incluyen, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, calorimetría isotérmica de valoración, anisotropía de fluorescencia y ensayos basados en ELISA, entre otros. La ELISA representa un procedimiento en particular útil para analizar la actividad de los anticuerpos, ya que dichos ensayos requieren típicamente concentraciones mínimas de anticuerpos. Una señal común que se analiza en un ensayo ELISA típico es la luminiscencia, que típicamente es el resultado de la actividad de una peroxidasa conjugada con un anticuerpo secundario que se une específicamente a un anticuerpo primario (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 de la invención). Los polipéptidos de la invención se pueden unir a TNFR2 y epítopos derivados del mismo, tales como epítopos que contienen uno o más de los residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KCRPG, como se muestra en las figuras 2A y 2B), así como péptidos aislados derivados de TNFR2 que preorganizan estructuralmente diversos residuos de manera que puedan simular la conformación de estos aminoácidos en la proteína natural. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención se pueden unir a péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las

posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7. En un experimento ELISA directo se puede cuantificar esta unión, por ejemplo, analizando la luminiscencia que se produce tras la incubación de un sustrato de HRP (por ejemplo, sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina) con un complejo antígeno-anticuerpo unido a un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden inducir una respuesta de luminiscencia de aproximadamente 400 unidades de absorbancia o más cuando se incuban con un antígeno inmovilizado en la superficie y un anticuerpo secundario conjugado con HRP en presencia de un sustrato de HRP (véase, por ejemplo, el ejemplo 3). En algunos modos de realización, la luminiscencia observada puede ser de aproximadamente 400 a aproximadamente 900 unidades de absorbancia (por ejemplo, 400-900 unidades de absorbancia, 500-800 unidades de absorbancia o 600-700 unidades de absorbancia). En casos particulares, la luminiscencia observada puede ser de aproximadamente 600 a aproximadamente 900 unidades de absorbancia (por ejemplo, 600-900 unidades de absorbancia o 700-800 unidades de absorbancia).

Propiedades cinéticas de polipéptidos antagonistas del TNFR2

Además de los parámetros termodinámicos de una interacción TNFR2-polipéptido, también es posible caracterizar cuantitativamente la asociación y disociación cinéticas de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención con TNFR2. Esto se puede hacer, por ejemplo, monitorizando la velocidad de formación del complejo anticuerpo-antígeno de acuerdo con procedimientos establecidos. Por ejemplo, se puede usar resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar las constantes de velocidad de la formación (k_{on}) y disociación (k_{off}) de un complejo anticuerpo-TNFR2. Estos datos también permiten calcular la constante de equilibrio (K_D) de la disociación del complejo anticuerpo-TNFR2, ya que la constante de equilibrio de esta disociación unimolecular se puede expresar como la proporción entre los valores de k_{off} y k_{on} . La SPR es una técnica que es en particular ventajosa para determinar los parámetros cinéticos y termodinámicos de las interacciones receptor-anticuerpo, ya que el experimento no requiere que un componente se modifique mediante la fijación de un marcador químico. En su lugar, el receptor se inmoviliza típicamente sobre una superficie metálica sólida que se trata en pulsos con soluciones de concentraciones crecientes de anticuerpo. La unión anticuerpo-receptor induce una distorsión en el ángulo de reflexión de la luz incidente en la superficie metálica, y este cambio en el índice de refracción a lo largo del tiempo a medida que se introduce el anticuerpo en el sistema se puede ajustar a modelos de regresión establecidos para calcular las constantes de velocidad de asociación y disociación de una interacción anticuerpo-receptor.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención presentan valores de k_{on} altos y de k_{off} bajos tras la interacción con TNFR2, consecuentes con la unión al receptor con alta afinidad. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden presentar valores de k_{on} en presencia de TNFR2 superiores a $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (por ejemplo, $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $5,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $6,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $7,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $8,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ o $1,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Los polipéptidos de la invención presentan valores de k_{off} bajos cuando se unen a TNFR2, ya que los anticuerpos pueden interactuar con epítomos de TNFR2 específicos con una alta afinidad. Los residuos dentro de estos epítomos forman fuertes contactos intermoleculares con TNFR2, lo que sirve para ralentizar la disociación del complejo polipéptido-TNFR2. Esta alta afinidad por el receptor se manifiesta en valores de k_{off} bajos. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden presentar valores de k_{off} inferiores a 10^{-3} s^{-1} cuando forman un complejo con TNFR2 (por ejemplo, $1,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $9,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $9,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $8,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $7,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $7,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $6,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $6,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $5,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $4,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $4,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $3,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $1,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $9,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $9,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $8,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $8,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $7,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $7,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $6,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $6,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $5,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $5,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $4,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $4,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $3,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $2,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $1,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$).

Epítomos dentro de TNFR2 unidos por polipéptidos antagonistas del TNFR2

Las altas afinidades de los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención por TNFR2, junto con el rápido inicio de la formación del complejo polipéptido-TNFR2 y la lenta disociación de estos complejos, hacen que estos polipéptidos sean muy adecuados para aplicaciones terapéuticas como supresores del crecimiento y proliferación de linfocitos T-reg. Los valores altos de k_{on} , por ejemplo, indican que los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden localizar en la superficie de una célula que expresa TNFR2 (por ejemplo, un linfocito T-reg) y asociar rápidamente con TNFR2, evitando de este modo la activación del receptor que de otro modo podría ser inducida por TNF α (por ejemplo, inhibiendo la trimerización de TNFR2 por TNF α). Además, la lenta disociación del complejo polipéptido-TNFR2 puede ser indicativa de una larga semivida del complejo *in vivo*, lo que da como resultado una regulación por disminución estable y sostenida del crecimiento de la célula que expresa TNFR2 (por ejemplo, regulación por disminución sostenida del crecimiento de T-reg). Estos parámetros termodinámicos y cinéticos ideales de la unión de TNFR2 son consecuentes con los fuertes contactos intermoleculares que se establecen tras la asociación de los polipéptidos de la invención con TNFR2.

Entre las dificultades para desarrollar polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) que puedan antagonizar TNFR2 han estado la elucidación de epítomos dentro de TNFR2 que participan en la formación de complejos antagonistas en lugar de epítomos que promueven la transducción de señales. Diversos fragmentos peptídicos discretos encontrados dentro de la estructura primaria de TNFR2 se unen a anticuerpos antagonistas de la invención en virtud de la orientación espacial de estos residuos en la conformación natural del receptor. Significativamente, ha resultado difícil identificar estos residuos, ya que muchos péptidos lineales aislados derivados de TNFR2 no parecen interactuar con polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) debido a las diferentes conformaciones que presentan estos péptidos cuando se preorganizan estructuralmente dentro de la proteína de longitud completa y cuando se aíslan en solución. El análisis del mapeo de epítomos usando péptidos cíclicos y bicíclicos restringidos derivados de diversas regiones del TNFR2 indica que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se unen a epítomos de regiones específicas de la secuencia de aminoácidos de TNFR2 de manera dependiente de la conformación. Los epítomos en particular importantes que se unen a polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención y promueven el antagonismo del receptor son aquellos que contienen uno o más residuos del motivo KCRPG (SEQ ID NO: 19), localizado en las posiciones 142-146 de la SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano. Uno o más de estos residuos residen dentro de epítomos más grandes (por ejemplo, los residuos 142-149 de SEQ ID NO: 7, mostrados en la figura 2A, y los residuos 137-144 de SEQ ID NO: 7, mostrados en la figura 2B) que pueden interactuar con anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención. El conocimiento de aquellos residuos que se unen selectivamente a polipéptidos antagonistas del TNFR2 se puede usar para identificar y diseñar una amplia gama de anticuerpos antagonistas del TNFR2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos usando técnicas de cribado de colecciones, por ejemplo, las descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar péptidos estructuralmente rígidos que contienen uno o más residuos dentro de la secuencia KCRPG (por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) para cribar y seleccionar polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y andamios similares a anticuerpos) que se unen a estos epítomos con alta afinidad y selectividad.

Varios residuos específicos dentro de TNFR2 se unen a polipéptidos antagonistas del TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, de la invención y establecen fuertes contactos intermoleculares con estos anticuerpos. En particular, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 funcionales de la invención se unen selectivamente a un epítomo que contiene uno o más residuos de los aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KCRPG, SEQ ID NO: 19). La orientación espacial de este epítomo se muestra en la figura 4. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden unir selectivamente a un epítomo de TNFR2 que contiene uno o más de estos residuos y específicamente no presentan unión específica a un epítomo que contiene los residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KCSPG, SEQ ID NO: 12). Por ejemplo, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) de la invención no presentan unión específica a epítomos que incluyen uno o más de, o todos, los residuos 48-67 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC, SEQ ID NO: 18), así como epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y epítomos que contienen sustituciones aminoácídicas conservadoras con respecto a esta secuencia (siempre que la secuencia de aminoácidos KCSPG esté presente en el epítomo). Se ha demostrado que polipéptidos que presentan la capacidad de unirse a un epítomo que contiene uno o más residuos de los aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano y un epítomo que contiene los residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano carecen de actividad inhibidora (antagonista). Por consiguiente, la capacidad de un anticuerpo contra TNFR2 para discriminar entre estos epítomos e interactuar específicamente con un epítomo que incluye uno o más de los residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano y para no participar en la unión específica con un epítomo compuesto por los residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano caracteriza los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención que antagonizan la señalización del TNFR2.

Un procedimiento ejemplar que se puede usar para predecir la actividad inhibidora de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra TNFR2 de la invención es comparar la afinidad del polipéptido por un péptido que contiene el motivo KCRPG (por ejemplo, un péptido lineal que tiene la secuencia KQEGCRLCAPLRKCRPGFGV, SEQ ID NO: 17) con la afinidad del mismo anticuerpo o fragmento de anticuerpo por un péptido que contiene la secuencia KCSPG (por ejemplo, un péptido lineal que tiene la secuencia QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC, SEQ ID NO: 18). Por ejemplo, el anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1 se une específicamente al fragmento peptídico definido por los residuos 130-149 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KQEGCRLCAPLRKCRPGFGV, SEQ ID NO: 17) con una afinidad 40 veces mayor que el fragmento peptídico definido por los residuos 48-67 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC, SEQ ID NO: 18). Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se unen a un epítomo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG (SEQ ID NO: 19) con una afinidad que es al menos 10 veces mayor que la afinidad del mismo polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno por

un péptido que contiene la secuencia KCSPG del TNFR2 humano (SEQ ID NO: 12). Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención se unen a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG (SEQ ID NO: 19) de TNFR2 humano con una afinidad que es 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces, 600 veces, 700 veces, 800 veces, 900 veces, 1000 veces o más de 1000 veces mayor que la afinidad del mismo único polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno por un péptido que contiene la secuencia KCSPG (SEQ ID NO: 12) del TNFR2 humano. Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se unen a epítopos que contienen uno o más residuos de la secuencia KCRPG (aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano) y epítopos que contienen el motivo KCSPG (aminoácidos 56-60 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano) con una afinidad similar (por ejemplo, inferior a una diferencia de afinidad de 10 veces) no se consideran polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención.

Además de uno o más residuos de los aminoácidos 142-146 de SEQ ID NO: 7, los polipéptidos de la invención también se pueden unir a uno o más residuos de un epítipo más grande que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 130-149 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KQEGCRLCAPLRKCRPGFVG, SEQ ID NO: 17) o a un epítipo que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir específicamente a un epítipo que contiene los residuos 142-149 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KCRPGFVG, SEQ ID NO: 20) o a un epítipo que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia (siempre que uno o más residuos de la secuencia KCRPG esté presente en el epítipo). Adicionalmente o de forma alternativa, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir específicamente a un epítipo que incluye los residuos 137-144 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CAPLRKCR, SEQ ID NO: 11) o a un epítipo que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia (siempre que uno o más residuos de la secuencia KCRPG esté presente en el epítipo).

Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir opcionalmente a un epítipo en dirección 3' compuesto por al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 150-190 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (ARPGTETSDVCKPCAPGTFSNTTSSDTCRPHQICNVVAI, SEQ ID NO: 22), así como a epítopos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia. Por ejemplo, en algunos modos de realización, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir específicamente a un epítipo que incluye residuos de las posiciones 161-169 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CKPCAPGTF, SEQ ID NO: 21), así como a epítopos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia.

Además de interactuar con uno o más residuos del motivo KCRPG (SEQ ID NO: 19), los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención también se pueden unir específicamente a un epítipo dentro del TNFR2 humano que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 75-128 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CDSCEDSTYTQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRPGWYCAL, SEQ ID NO: 13), así como a epítopos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia. Los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención también se pueden unir específicamente a un epítipo dentro del TNFR2 humano que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 75-91 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CDSCEDSTYTQLWNWVP, SEQ ID NO: 14), así como a epítopos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia. En algunos modos de realización, los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden unir específicamente a un epítipo que incluye residuos en las posiciones 80-86 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (DSTYTQL, SEQ ID NO: 8), así como a epítopos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítopos que contienen sustituciones aminoácidas conservadoras con respecto a esta secuencia. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención también se pueden unir específicamente a un epítipo que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 86-103 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (LWNWVPECLSCGSRCSDD, SEQ ID NO: 15),

así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. En algunos modos de realización, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden unir específicamente a un epítomo que incluye residuos en las posiciones 91-98 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (PECLSCGS, SEQ ID NO: 9), así como a un epítomo que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención también se pueden unir específicamente a un epítomo que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 111-128 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (TREQNRICRPGWYCAL, SEQ ID NO: 16), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. En algunos modos de realización, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se pueden unir específicamente a un epítomo que incluye residuos en las posiciones 116-123 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (RICTCRPG, SEQ ID NO: 10), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. Por ejemplo, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir específicamente a un epítomo que contiene los residuos 116-123 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (RICTCRPG, SEQ ID NO: 10) y los residuos 137-144 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CAPLRKCR, SEQ ID NO: 11).

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir a un epítomo dentro de los aminoácidos 112-131 de SEQ ID NO: 7 (REQNRICRPGWYCALSKQ), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. Adicionalmente o de forma alternativa, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir a un epítomo dentro de los aminoácidos 120-139 de SEQ ID NO: 7 (CRPGWYCALSKQEGCRLCAP), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir a un epítomo dentro de los aminoácidos 128-147 de SEQ ID NO: 7 (LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden unir opcionalmente a un epítomo dentro de los aminoácidos 136-155 de SEQ ID NO: 7 (LCAPRLKCRPGFGVARPGTE), así como a epítomos que presentan al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con esta secuencia y a epítomos que contienen sustituciones aminoacídicas conservadoras con respecto a esta secuencia.

Polipéptidos antagonistas del TNFR2 que se unen a TNFR2 de animales no humanos

Además de unirse a epítomos dentro de TNFR2 humano que contienen el motivo KCRPG, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención también incluyen aquellos que se unen específicamente a epítomos que contienen el motivo equivalente dentro de TNFR2 derivados de animales no humanos, tales como mamíferos no humanos, por ejemplo, en una vaca, bisonte, ratón o rata, entre otros. La localización de secuencias equivalentes al motivo KCRPG humano en TNFR2 derivados de mamíferos no humanos ejemplares se muestra en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2. Localización de secuencias equivalentes a KCRPG en TNFR2 de mamíferos no humanos

Fuente de TNFR2	Secuencia equivalente a KCRPG	Posiciones de aminoácidos de secuencia equivalente dentro de TNFR2	SEQ ID NO. de secuencia de TNFR2 de longitud completa	N.º de acceso a Genbank de la secuencia de TNFR2 de longitud completa
Humano	KCRPG	142-146	7	P20333.3
Ganado	KCGGP	142-146	280	AAI05223
Bisonte	KCGGP	142-146	281	XP_010848145
Ratón	KCGGP	144-148	282	AAA39752.1

Fuente de TNFR2	Secuencia equivalente a KCRPG	Posiciones de aminoácidos de secuencia equivalente dentro de TNFR2	SEQ ID NO. de secuencia de TNFR2 de longitud completa	N.º de acceso a Genbank de la secuencia de TNFR2 de longitud completa
Rata	KCGGP	144-148	283	Q80WY6

Los epítomos dentro de TNFR2 derivados de los mamíferos no humanos analizados anteriormente que se pueden unir por polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención se resumen en la alineación de secuencias a continuación. Esta alineación de secuencias muestra secuencias parciales de TNFR2 derivados de humano, ganado bovino, bisonte, ratón y rata, así como epítomos (resaltados en gris) equivalentes al motivo KCRPG humano.

5

Alineación de secuencias parciales de TNFR2 derivadas de humanos y mamíferos no humanos seleccionados

Humano: 1	MAEVUWAALAVGLLELMAAAHALPAQVAFTPYAPZP22GSTERL--REYYDQTAQMCCSKCSPGQHAQVFPCTKTSTDTVCDSC	78
Canado: 1	MAPTAFAAALAVGLQFWAAGRAVPAQAVTPYIF22GSSCRQ---QEYVNOKIOMCCSKCPFGYRVQSLCNMTLDTICASC	78
Bisonte: 1	MAPTAFAAALAVGLQFWAAGRAVPAQAVTPYIF22GSSCRQ---QEYVNHKIOMCCSKCPFGYRVQSLCNMTLDTICASC	78
Ratón: 1	MAFAALWVALVPELQLMATCHTVPAAVVLTPYKPEEGYECQIS-QEYVDRKAQMCCCAKCPFGYVVKHFCNKTSTDTVCADC	79
Rata: 1	MAFAALWVALVPELQLMATCHTVPAAVVLTPYKPEEGNQCCIS-QEYVDRKAQMCCCAKCPFGYVVKHFCNKTSTDTVCADC	79
Humano: 79	EDSTYTQUMNWVPECLSCGSRCS SDQVETOACTREONRICICRPGMYCALSKQEG-CRLCAPLKRCPFGVARPCTETS	157
Canado: 79	ESSTYTQUMNLVTACFSCNRCSSDQVETOACTKQKRICICTCKPGMYCTLGPQEG-CRLCVALRKCPFGVAKPGTATT	157
Bisonte: 79	ESSTYTQUMNLVTACFSCNRCSSDQVETOACTKQKRICICTCKPGMYCTLGPQEG-CRLCVALRKCPFGVAKPGTATT	157
Ratón: 80	EASMYTQVMNQFRICLSCSSCTDQVEIRACTNQNRVCAEAGRYCALKTHSGSCRCQCMRLSKCPFGVASSRAPNG	159
Rata: 80	AAGMFTQVMNHLHTCLSCSSCTDQVETHNCTKQNRVCAEAGRYCALKTHSGSCRCQCMRLSKCPFGVASSRAPNG	159
Humano: 150	DVVCAPCAPGIEFSTSTSDICRPHQICNVVAIFGNASMDAVCT-----STSPTRSMAPGAVHLPQPVSTERSQHTQPTT	231
Canado: 150	NVICAPCGPIEFSDTTSYDTCKPHRNCSSVAIPGTASTDAVCT-----SVLNTKRVARG-----PATERSQHMEPTL	229
Bisonte: 158	NVICAPCGPIEFSDTTSYDTCKPHRNCSSVAIPGTASTDAVCT-----SVLNTKRVARG-----PATERSQHMEPTL	229
Ratón: 160	NVLCKACAPGIEFSDTTSSTDVCRPHRICSIILAIPOASTDAVCAPESTLSAIPR-----TIYVSQPEPTRSQPLDQEP	233
Rata: 160	NVICSACAPGIEFSDTTSSTDVCRPHRICSIILAIPOASTDAVCAPESTPSAVER-----TIYVSQPEPTRSQPMQEP	233
Humano: 232	KESTAPSTGELLPMGPSPFA---EGSTGDFALPVGLIVGVIALGLLIIGVWNCVIMTQVKKKPLCLOREAKVPHLPADK	307
Canado: 226	GESTAPSTFELLPKVPSPSPSPVEQPNIGNISLPIELIVGVIALGLLIIVWNCVIMTQVKKKPPFLOQDAKVPHPANK	305
Bisonte: 226	GPSTAPSTFELLPKVPSPSPSPVEQPNIGNISLPIELIVGVIALGLLIIVWNCVIMTQVKKKPPFLOQDAKVPHPANK	305
Ratón: 234	GPSQTPS---ILTSLGSTPI---LBQSTKGGISLPIGLIVGVTSGLIMIGLVNCIILVQRKKKPPSCLOQDAKVPHPDEN	308
Rata: 234	GPSQTEH---LTVSLGSTPI---LEPSITGGISLPIGLIVGLTITGLIMIGLVNCIILVQRKKKPPSCLOQRETMVPHLPDOK	308
Humano: 300	ARGTQGPQQHLLITAPSSSSSSSLESASALDRAPTRNQOPAPGVE-ASGAGEAPASTGSSSDSSFGGCTQVNVTCIVN	386
Canado: 306	AQGAPGPEQQHLLITAPSSSSSSSLESSTSTSDKRAPTRSQLOSPGVEKASTSGEAQTGCSSESSEASSGGCTQVNVTCIVN	389
Bisonte: 306	AQGAPGPEQQHLLITAPSSSSSSSLESSTSTSDKRAPTRSQLOSPGVE-ANTSGEAQTGCSSESSEASSGGCTQVNVTCIVN	384
Ratón: 309	SQDAVGLQEQHLLITAPSSSSSLESASACDRAPFGCHPQARVMAEAQGFQBARPASSRISDSHSGSKCTHVVVTCIVN	388
Rata: 309	SQDAICLEQQHLLITAPSSSSSLESASACDRAPFGCHPQARVTAEAQGSQBARACAGSRSSDSHSGSECTHVVVTCIVN	388

El anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1

- 5 Un polipéptido antagonista del TNFR2 representativo (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención se puede basar en TNFRAB1, también denominado en

el presente documento antagonista 1 de TNFR2, que es un anticuerpo murino que antagoniza la interacción TNFR α -TNFR2 y puede suprimir la proliferación de linfocitos T-reg mediada por TNF α (véase, por ejemplo, la figura 5). Las regiones variables de TNFRAB1 (por ejemplo, las CDR de la cadena pesada y ligera) y variantes de las mismas que presentan propiedades de unión específica sustancialmente similares a TNFRAB1, se pueden usar para preparar un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, por ejemplo, reemplazando la región constante de ratón de TNFRAB1 por una región constante no natural (por ejemplo, una región constante de un anticuerpo humano) usando procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) de la invención pueden presentar propiedades de unión que son iguales o similares a las de TNFRAB1. Estas propiedades son las siguientes: En presencia de TNFR2, TNFRAB1 presenta un valor de k_{on} alto de $4,98 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, así como un valor de k_{off} bajo de $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y una K_D de aproximadamente 44,4 pM en complejo con TNFR2. La alta afinidad de TNFRAB1 por TNFR2 junto con la rápida formación y la lenta disociación del complejo TNFRAB1-TNFR2 es consecuente con los fuertes contactos intermoleculares que sustentan esta interacción proteína-proteína. TNFRAB1 se une a epítomos específicos dentro de la estructura primaria de TNFR2 que están alineados espacialmente en la conformación natural del receptor. Se ha identificado el motivo KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20) y, específicamente, la secuencia KCRPG (SEQ ID NO: 19) como un componente en particular importante del epítomo funcional que establece fuertes contactos intermoleculares con TNFRAB1, según se determina por el análisis del mapeo de epítomos (figuras 2 y 3). La interacción de estos residuos con polipéptidos anti-TNFR2 de la invención promueve selectivamente la actividad antagonista. Significativamente, un epítomo de TNFR2 que incluye los residuos aminoácidos 56-60 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (KCSPG, SEQ ID NO: 12) no es parte específicamente del epítomo conformacional que se une específicamente por TNFRAB1 o polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención, ya que se ha demostrado que la unión específica a ambos epítomos da lugar a una pérdida o reducción significativa de la actividad antagonista. Por consiguiente, los polipéptidos contra TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a ambos de estos epítomos (KCSPG y un epítomo que contiene al menos la secuencia KCR y, más específicamente, la secuencia KCRPG del TNFR2 humano) no se consideran polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención.

Además de unirse a un epítomo contenido dentro de la secuencia KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20), TNFRAB1 también se une a un epítomo en dirección 3' contenido dentro de una secuencia definida por las posiciones 161-169 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CKPCAPGTF, SEQ ID NO: 21). Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos anti-TNFR2 de la invención también se pueden unir a este epítomo o a una región más grande dentro de TNFR2 que contiene este epítomo (por ejemplo, una secuencia que incluye al menos cinco residuos continuos o discontinuos de las posiciones 150-190 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (ARPGTETSDVVCKPCAPGTFSTNTSSTDICRPHQICNVVAI, SEQ ID NO: 22).

TNFRAB1 contiene dos cadenas pesadas, así como dos cadenas ligeras, como se muestra en las figuras 1A y 1B. Las cadenas pesadas de TNFRAB1 contienen la siguiente secuencia de aminoácidos (las CDR se indican en negrita):

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GGFTFSSY**VMSWVROTPEKRLEWVATIS**SGGSY**TYYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLQMSLRSEDTAMYYCAR**QRVDGYSSYWF**FDVWGAGTAVTVSS (SEQ ID NO: 2)

La secuencia de la cadena ligera de TNFRAB1 es como sigue (las CDR se indican en negrita):

DIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSA**SSSVYYMY**WFQOKPGTSPKLWY**STSNLASG**VPVRFSGSGSGT**SY**
SLTISRMEAEDAATYYC**QQRNYPYTF**GGG**TKLEIKRA**
(SEQ ID NO: 4)

El anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB2

Un polipéptido antagonista del TNFR2 representativo (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención se puede basar en TNFRAB2, también denominado en el presente documento antagonista 2 de TNFR2, un anticuerpo que se une selectivamente e inhibe TNFR2 en virtud de la unión específica a diversos epítomos dentro de este receptor. Por ejemplo, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden presentar propiedades de unión que son iguales o similares a las de TNFRAB2. Estas propiedades son las siguientes: En presencia de TNFR2, TNFRAB2 presenta un valor de k_{on} alto de $3,6099 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, así como un valor de k_{off} bajo de $2,24 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y una K_D de aproximadamente 621 pM en complejo con TNFR2. Se ha identificado un epítomo que contiene los residuos 137-144 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (CAPLRKCR, SEQ ID NO: 11) como un componente en particular importante del epítomo funcional que establece fuertes contactos intermoleculares con TNFRAB2, según se determina por el análisis del

mapeo de epítomos (véanse, por ejemplo, el ejemplo 1 y las figuras 2B y 3B). En la invención se incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra TNFR2 que se unen específicamente a este epítomo.

Además de unirse a un epítomo que contiene residuos CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11), TNFRAB2 también se une a epítomos que incluyen uno o más residuos dentro de las posiciones 80-86 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (DSTYTQL, SEQ ID NO: 8), las posiciones 91-98 de la SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (PECLSCGS, SEQ ID NO: 9), así como las posiciones 116-123 de la SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (RICTCRPG, SEQ ID NO: 10). Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra TNFR2 de la invención también se pueden unir a uno o más de estos epítomos. Los polipéptidos de la invención se pueden diseñar e identificar usando el conocimiento de los epítomos unidos específicamente por TNFRAB2. Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una variedad de técnicas de presentación de péptidos *in vitro* o cribados de colecciones combinatorias de anticuerpos como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica para cribar polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) que se pueden unir a estos epítomos con alta afinidad y selectividad.

Además, los polipéptidos contra TNFR2 de la invención incluyen aquellos que contienen una o más de las CDR de la cadena pesada y ligera o regiones variables de la cadena pesada y ligera de TNFRAB2 y una región constante que no es natural con respecto a la de TNFRAB2 (por ejemplo, una región constante de un anticuerpo humano). Las CDR de la cadena pesada y la cadena ligera de TNFRAB2 se muestran a continuación:

CDR-H1 de TNFRAB2: GYTFTDY(L/I) (SEQ ID NO: 257)

CDR-H2 de TNFRAB2: VDPEYGST (SEQ ID NO: 258)

CDR-H3 de TNFRAB2: ARDDGSYSFPDYWG (SEQ ID NO: 259)

CDR-L1 de TNFRAB2: QNINKY (SEQ ID NO: 260)

CDR-L2 de TNFRAB2: TYS o YTS

CDR-L3 de TNFRAB2: CLQYVNL(L/I)T (SEQ ID NO: 261)

Como se muestra anteriormente, la secuencia de CDR-H1 de TNFRAB2 puede contener un residuo de leucina o bien de isoleucina en la octava posición de esta región. De forma similar, la CDR-L2 de TNFRAB2 puede incluir un tripéptido TYS o YTS, y la CDR-L3 de TNFRAB2 puede contener un residuo de leucina o bien de isoleucina en la octava posición de esta región. En particular, la CDR-L2 de TNFRAB2 está flanqueada por los residuos estructurales N terminales LLIR (SEQ ID NO: 262) y los residuos estructurales C terminales TLE. En consecuencia, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen aquellos que contienen una o más de las CDR de TNFRAB2 anteriores, así como los residuos LLIR N terminales (SEQ ID NO: 262) y los residuos TLE C terminales que flanquean la secuencia de CDR-L2 del anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Determinantes moleculares de afinidad por y antagonismo de TNFR2

En particular, existen similitudes de secuencia específicas entre las CDR de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 TNFRAB1 y TNFRAB2. Un análisis de los residuos comunes en las CDR de ambos anticuerpos proporciona información sobre los rasgos característicos moleculares de los anticuerpos que se unen a TNFR2 y presentan un efecto antagónico. El análisis del mapeo de epítomos ha demostrado que tanto TNFRAB1 como TNFRAB2 se unen a TNFR2 en una configuración de dímero antiparalelo. Estos anticuerpos se unen a un epítomo dentro de TNFR2 que contiene los residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7 y no se unen a epítomos que contienen los residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7. Las similitudes estructurales entre las regiones CDR-H y CDR-L correspondientes proporcionan una base para predecir sustituciones de residuos que pueden preservar o potenciar la afinidad por y el antagonismo de TNFR2. La inspección de las secuencias de CDR de la cadena pesada y la cadena ligera de estos anticuerpos demuestra que varios residuos y características fisicoquímicas se conservan dentro de las secuencias de CDR correspondientes, mientras que otras posiciones dentro de estas CDR se pueden variar significativamente sin pérdida de afinidad y función antagonista. Por ejemplo, a continuación se muestran las secuencias de CDR-H1 de TNFRAB1 y TNFRAB2:

GFTFSSY (CDR-H1 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 23)

GYTFTDY (L/I) (CDR-H1 de TNFRAB2, SEQ ID NO: 257)

G-TF--Y- (Secuencia consenso)

La alineación de las secuencias revela un motivo GXTFXXY compartido, en el que "X" designa cualquier aminoácido. Estas secuencias de CDR-H1 presentan un residuo de glicina conservado en la primera posición y

residuos de treonina, fenilalanina y tirosina conservados en las posiciones tercera, cuarta y séptima, respectivamente. La inspección de estas secuencias demuestra que la región CDR-H1 tolera sustituciones en las posiciones restantes. Se toleran cadenas laterales de polaridad variable en la segunda posición, por ejemplo, ya que tanto la fenilalanina, que contiene un resto fenilo hidrófobo y no sustituido, como la tirosina, que contiene un sustituyente hidroxilo prótico, se encuentran en esta posición en la región CDR-H1 de TNFRAB1 y TNFRAB2, respectivamente. Adicionalmente, mientras que las posiciones quinta y sexta están ocupadas por residuos polares de serina en la CDR-H1 de TNFRAB1, estas posiciones presentan una treonina, que contiene un sustituyente metilo hidrófobo adicional, y ácido aspártico, que es aniónico a pH fisiológico, en TNFRAB2. Esta diversidad demuestra que estas posiciones se pueden sustituir por aminoácidos de diversas propiedades electrostáticas sin pérdida de afinidad por y antagonismo de TNFR2.

El análisis de secuencias de las regiones CDR-H2 de TNFRAB1 y TNFRAB2 revela de forma similar un conjunto de aminoácidos conservados en diversas posiciones a lo largo de estas regiones:

SSG--GSY	(CDR-H2 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 24)
VDPEYGST	(CDR-H2 de TNFRAB2, SEQ ID NO: 258)
-----GS-	(Secuencia consenso)

El análisis de esta alineación de secuencias demuestra que las secuencias de CDR-H2 presentan un motivo GS conservado en el extremo C terminal de la región CDR-H2, con cadenas laterales de tamaño molecular, polaridad y carga electrostática variables toleradas en las posiciones restantes. Adicionalmente, a continuación se muestra la alineación de las secuencias de CDR-H3 correspondientes de TNFRAB1 y TNFRAB2:

QRVDGYSSYWYFDV	(CDR-H3 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 25)
ARDDG-S-YSPFDYWG	(CDR-H3 de TNFRAB2, SEQ ID NO: 259)
-R-DG-S-Y--FD---	(Secuencia consenso)

Un análisis similar de las secuencias de CDR-H3 de TNFRAB1 y TNFRAB2 revela residuos de arginina, ácido aspártico, glicina, serina, tirosina y fenilalanina conservados en toda esta CDR. En particular, en las posiciones restantes se toleran residuos de propiedades estéricas y electrostáticas variables. Por ejemplo, la primera posición de la secuencia de CDR-H3 tolera residuos aminoacídicos de tamaño y tendencias a formar enlaces de hidrógeno contrarias, ya que la primera posición de CDR-H3 en TNFRAB1 presenta un residuo polar de glutamina que contiene una cadena lateral de carboxamida con restos donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, mientras que en la posición correspondiente de TNFRAB2 se encuentra un residuo de alanina que porta una cadena lateral metilo no funcionalizada. Además, la tercera posición en las secuencias de CDR-H3 anteriores presenta una valina hidrófoba en TNFRAB1 y un resto aniónico de ácido aspártico en la posición correspondiente de TNFRAB2.

Un análisis similar revela rasgos característicos moleculares comunes en las secuencias de CDR-L de TNFRAB1 y TNFRAB2. Por ejemplo, a continuación se muestran las secuencias de CDR-L1 de TNFRAB1 y TNFRAB2:

SASSSVYYMY	(CDR-L1 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 26)
Q-N--INK-Y	(CDR-L1 de TNFRAB2, SEQ ID NO: 260)
Y	(Residuo consenso)

La inspección de estas secuencias revela que en la posición final de CDR-L1 aparece un residuo de tirosina que contiene hidroxilo, mientras que en las posiciones restantes se toleran residuos de propiedades fisicoquímicas variables. De forma similar, el análisis de las regiones CDR-L2 de TNFRAB1 y TNFRAB2 revela un aminoácido conservado en la posición final en ambas regiones:

STSNLAS	(CDR-L2 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 27)
TY----S	o (CDR-L2 de TNFRAB2)
YT----S	
S	(Residuo consenso)

El análisis de la alineación de secuencias anterior demuestra que los residuos de serina aparecen en la tercera posición de estas secuencias de CDR-L2, mientras que en los residuos restantes se toleran ampliamente las sustituciones. De forma similar, las secuencias de CDR-L3 de TNFRAB1 y TNFRAB2 son como sigue:

Q-QRRNYPY-----T (CDR-L3 de TNFRAB1, SEQ ID NO: 28)
 CLQ---YVNL (L/I) T (CDR-L3 de TNFRAB2, SEQ ID NO: 261)
 -----Y-----T (Secuencia consenso)

El análisis de las secuencias de CDR-L3 de TNFRAB1 y TNFRAB2 revela una preferencia por residuos de tirosina y treonina en posiciones específicas dentro de estas regiones, mientras que en otras posiciones se toleran aminoácidos de una amplia gama de características fisicoquímicas, incluyendo residuos con cadenas laterales catiónicas (Arg), cadenas laterales conformacionalmente restringidas (Pro) y cadenas laterales de polaridad variable (por ejemplo, Gln, Asn, Leu y Val). En conjunto, los rasgos característicos estructurales compartidos de las secuencias de CDR-H y CDR-L anteriores proporcionan información sobre aquellos residuos que son importantes para la unión selectiva de uno o más residuos del epítipo KCRPG de TNFR2 (posiciones 142-146 de SEQ ID NO: 7, mostrado en SEQ ID NO: 19) en una configuración de dímero antiparalelo y demuestran que se pueden variar determinados aminoácidos manteniendo la afinidad y la actividad antagonista.

Por lo tanto, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden tener CDR de la cadena pesada y la cadena ligera que contienen las secuencias consenso anteriores. Por ejemplo, los antagonistas del TNFR2 de la invención pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5$ o $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5J$; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_3Z^4Z^3J$ o $(J)_5Z^4Z^3J$; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $JZ^1JZ^2Z^4JZ^3JZ^5(J)_2Z^5Z^2Z^5$ o $JZ^1JZ^2Z^4Z^3Z^5(J)_2Z^5Z^2Z^5(J)_2$; una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_9Z^5$ o $(J)_5Z^5$; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_6Z^3$ o $(J)_2Z^3$; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_5Z^5(J)_2Z^3$ o $(J)_3Z^5(J)_4Z^3$; en la que cada J es independientemente un aminoácido natural; cada Z^1 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico; cada Z^2 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico; cada Z^3 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico; cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; y cada Z^5 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral hidrófoba.

En algunos modos de realización, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $GJTF(J)_2Y$ (SEQ ID NO: 276) o $GJTF(J)_2YJ$ (SEQ ID NO: 277); una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_3GSJ$ o $(J)_5GSJ$; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $JRJDGJSJY(J)_2FDJ$ (SEQ ID NO: 278) o $JRJDGSY(J)_2FD(J)_3$ (SEQ ID NO: 279); una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_9Y$ o $(J)_5Y$; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_6S$ o $(J)_2S$; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_5Y(J)_2T$ o $(J)_3Y(J)_4T$; en la que cada J es independientemente un aminoácido natural.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $Z^4FZ^3Z^5SSZ^5$ o $Z^4YZ^3Z^5TDZ^5X$; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $SSGZ^4Z^3Y$ (SEQ ID NO: 263) o $VDPEYZ^4Z^3T$ (SEQ ID NO: 264); una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $QZ^1VZ^2Z^4YZ^3SZ^5WYZ^5Z^2Z^5$ (SEQ ID NO: 265) o $AZ^1DZ^2Z^4Z^3Z^5SPZ^5Z^2Z^5WG$ (SEQ ID NO: 266); una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $SASSSVYYMZ^5$ (SEQ ID NO: 267) o $QNINKZ^5$ (SEQ ID NO: 268); una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $STSNLAZ^3$ (SEQ ID NO: 269), TYZ^3 o YTZ^3 ; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $QRRNZ^5PYZ^3$ (SEQ ID NO: 270) o $CLQZ^5VNLXZ^3$ (SEQ ID NO: 271); en la que cada Z^1 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico; cada Z^2 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico; cada Z^3 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico; cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; cada Z^5 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba; y cada X es independientemente leucina o isoleucina.

En algunos modos de realización, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $GFTFSSY$ (SEQ ID NO: 23), $GYTFTDYX$ (SEQ ID NO: 257) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $SSGGSY$ (SEQ ID NO: 24), $VDPEYGST$ (SEQ ID NO: 258) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $QRVDGYSSYWFYFDV$ (SEQ ID NO: 25), $ARDDGSYSPFDYWG$ (SEQ ID NO: 259) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $SASSSVYYMY$ (SEQ ID NO: 26), $QNINKY$ (SEQ ID NO: 260) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $STSNLAS$ (SEQ ID NO: 27), TYS , YTS o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a SEQ ID NO: 27; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $QRRNYPYT$ (SEQ ID NO: 28), $CLQYVNLXT$ (SEQ ID NO: 29).

261) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias.

Anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos derivados de TNFRAB1 y/o TNFRAB2

Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos humanos, humanizados, primatizados y quiméricos que contienen una o más de las CDR de TNFRAB1 o una CDR que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen mutaciones conservadoras con respecto a estas CDR. Los anticuerpos de la divulgación también incluyen anticuerpos humanos, humanizados, primatizados y quiméricos que contienen una o más de las CDR de TNFRAB2 o una CDR que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen mutaciones conservadoras con respecto a estas CDR. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación también incluyen anticuerpos humanos, humanizados, primatizados y quiméricos que contienen una o más CDR que son idénticas a las CDR anteriores excepto por sustituciones aminoacídicas conservadoras. En algunos modos de realización, un anticuerpo humanizado, primatizado o quimérico puede contener una o más de las CDR de TNFRAB1 o una CDR que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de las CDR de TNFRAB1 o secuencias que contienen mutaciones conservadoras con respecto a estas CDR, y una o más CDR de TNFRAB2 o una CDR que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de las CDR de TNFRAB2 o secuencias que contienen mutaciones conservadoras con respecto a estas CDR. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la divulgación se pueden generar incorporando cualquiera de las CDR anteriores en las regiones estructurales (por ejemplo, FW1, FW2, FW3 y FW4) de un anticuerpo humano. Las regiones estructurales ejemplares que se pueden usar para el desarrollo de un anticuerpo anti-TNFR2 humanizado que contiene una o más de las CDR anteriores incluyen, sin limitación, las descritas en la patente de EE. UU. n.º 7.732.578, la patente de EE. UU. n.º 8.093.068 y el documento WO 2003/105782.

Una estrategia que se puede usar para diseñar anticuerpos humanizados de la invención es alinear las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo antagonista de TNFR2, tal como TNFRAB1 o TNFRAB2, con la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humano consenso. Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos consenso son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBASE"; véase también Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-98, 1992; y Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836, 1994). De esta manera, los residuos estructurales del dominio variable y las CDR se pueden identificar mediante alineación de secuencias (véase Kabat, supra). Se pueden sustituir una o más CDR de los dominios variables de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo humano consenso por una o más CDR correspondientes de un anticuerpo antagonista del TNFR2, tal como TNFRAB1 o TNFRAB2, para producir un anticuerpo contra TNFR2 humanizado. Los dominios variables ejemplares de un anticuerpo humano consenso incluyen el dominio variable de la cadena pesada:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS¹SDYAMSWWRQAPGKGLEWVAVISENGSD²TTYADSVKGR³
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD⁴RGGAVSYFDVWVGQGT⁵LVTVSS (SEQ ID NO: 32)

y el dominio variable de la cadena ligera:

DIQMTQSPFSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPKAPKLLIYAASSLES¹GVPSRFSGSGSGT²
DFTLTIS³SLQPEDFATYYCQQYN⁴SLPYTFGQGT⁵KVEIKRT (SEQ ID NO: 33)

identificado en la patente de EE. UU. n.º 6.054.297 (las CDR mostradas en negrita se determinaron de acuerdo con el procedimiento de Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987). Estas sustituciones aminoacídicas se pueden preparar, por ejemplo, mediante expresión recombinante de polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humanizado en una célula huésped usando procedimientos conocidos en la técnica o descritos en el presente documento.

De forma similar, esta estrategia también se puede usar para producir anticuerpos anti-TNFR2 primatizados, ya que se pueden sustituir las CDR de los dominios variables de la cadena pesada y/o ligera de una secuencia consenso de anticuerpo de primate por una o más CDR correspondientes de TNFRAB1 y/o TNFRAB2. Secuencias de anticuerpos de primates conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780).

En algunos modos de realización, puede ser deseable importar residuos estructurales particulares además de secuencias de CDR de un anticuerpo contra TNFR2, tal como TNFRAB1 o TNFRAB2, en los dominios variables

de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.054.297 identifica varios casos en los que puede ser ventajoso retener determinados residuos estructurales de una región variable de la cadena pesada o la cadena ligera de un anticuerpo particular en el anticuerpo humanizado resultante. En algunos modos de realización, los residuos estructurales pueden participar en interacciones no covalentes con el antígeno y contribuir por tanto a la afinidad del anticuerpo por el antígeno diana. En otros casos, los residuos estructurales individuales pueden modular la conformación de una CDR e influir por tanto indirectamente en la interacción del anticuerpo con el antígeno. De forma alternativa, determinados residuos estructurales pueden formar la interfaz entre los dominios VH y VL y, por lo tanto, pueden contribuir a la estructura global del anticuerpo. En otros casos, los residuos estructurales pueden constituir sitios de glucosilación funcionales (por ejemplo, Asn-X-Ser/Thr) que pueden dictar la estructura del anticuerpo y la afinidad por el antígeno tras la unión a restos de carbohidratos. En casos como los descritos anteriormente, puede ser beneficioso retener determinados residuos estructurales de un anticuerpo contra TNFR2 (por ejemplo, TNFRAB1 o TNFRAB2) en los anticuerpos antagonistas y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, tales como anticuerpos humanizados, ya que diversos residuos estructurales pueden promover una alta afinidad por el epítipo y una actividad bioquímica mejorada del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los anticuerpos de la invención también incluyen fragmentos de anticuerpos, dominios Fab, moléculas F(ab'), moléculas F(ab')₂, fragmentos variables monocatenarios (scFv), fragmentos scFv en tándem, diacuerpos, tricuerpos, inmunoglobulinas de dominio variable dual, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos heteroespecíficos que contienen las CDR de TNFRAB1 o TNFRAB2 (por ejemplo, una CDR que contiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 23-28). Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación incluyen aquellos que también contienen CDR que tienen entre una y tres sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de TNFRAB1 o TNFRAB2. Estas moléculas se pueden expresar de forma recombinante, por ejemplo, incorporando polinucleótidos que codifican estas proteínas en vectores de expresión para la transfección en una célula eucariota o procariota usando técnicas descritas en el presente documento o conocidas en la técnica, o se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida descritos en el presente documento o conocidos en la técnica.

Los anticuerpos de la divulgación incluyen adicionalmente andamios similares a anticuerpos que contienen una o más de las CDR de TNFRAB1 o TNFRAB2 o una CDR que presenta al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen entre una y tres sustituciones aminoacídicas (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de TNFRAB1 o TNFRAB2. Ejemplos de andamios similares a anticuerpos incluyen proteínas que contienen un décimo dominio de fibronectina tipo III (¹⁰Fn3), que contiene bucles estructurales BC, DE y FG análogos a los anticuerpos canónicos. Se ha demostrado que la estructura terciaria del dominio ¹⁰Fn3 se asemeja a la de la región variable de la cadena pesada de IgG, y un experto en la técnica puede injertar, por ejemplo, una o más CDR de TNFRAB1 y/o TNFRAB2 o secuencias que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen sustituciones aminoacídicas conservadas con respecto a estas CDR en el andamio de fibronectina reemplazando residuos de los bucles BC, DE y FG de ¹⁰Fn3 por residuos de CDR de TNFRAB1 y/o TNFRAB2. Esto se puede lograr mediante expresión recombinante de un dominio ¹⁰Fn3 modificado en una célula procariota o eucariota (por ejemplo, usando los vectores y técnicas descritos en el presente documento). Ejemplos de uso del dominio ¹⁰Fn3 como un andamio similar a anticuerpo para el injerto de CDR de anticuerpos en los bucles estructurales BC, DE y FG se informan en los documentos WO 2000/034784, WO 2009/142773, WO 2012/088006, y la patente de EE. UU. n.º 8.278.419.

Polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2

Los antagonistas del TNFR2 de la invención pueden estar en forma de un polipéptido monocatenario, tal como un polipéptido monocatenario que contiene tres CDR de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal antagonista del TNFR2 descrito en el presente documento (por ejemplo, TNFRAB1 o TNFRAB2), y tres CDR de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal antagonista de TNFR2 descrito en el presente documento (por ejemplo, TNFRAB1 o TNFRAB2). Los polipéptidos monocatenarios pueden estar en forma de un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo descrito en el presente documento o conocido en la técnica, tal como un fragmento scFv. Los polipéptidos monocatenarios pueden contener de forma alternativa una o más CDR descritas en el presente documento unidas covalentemente entre sí usando técnicas de formación de enlaces convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante un enlace amida, un enlace tioéter, un enlace carbono-carbono, o mediante un conector, tal como un conector peptídico o un electrófilo multivalente (por ejemplo, un derivado de bis(bromometil)areno, tal como bis(bromometil)benceno o bis(bromometil)piridina) descrito en el presente documento o conocido en la técnica.

Por ejemplo, los polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2 de la divulgación pueden tener una o más CDR de la cadena pesada y la cadena ligera que contienen las secuencias consenso descritas anteriormente que promueven la unión selectiva a epítopos de TNFR2, tales como el motivo KCRPG (SEQ ID NO: 19), e inducen el antagonismo de TNFR2. Por ejemplo, los polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2 de la divulgación

pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5$ o $Z^4JZ^3Z^5(J)_2Z^5J$; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_3Z^4Z^3J$ o $(J)_5Z^4Z^3J$; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos $JZ^1JZ^2Z^4JZ^3JZ^5(J)_2Z^5Z^2Z^5$ o $JZ^1JZ^2Z^4Z^3Z^5(J)_2Z^5Z^2Z^5(J)_2$; una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_9Z^5$ o $(J)_5Z^5$; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_6Z^3$ o $(J)_2Z^3$; y una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos $(J)_5Z^5(J)_2Z^3$ o $(J)_3Z^5(J)_4Z^3$; en la que cada J es independientemente un aminoácido natural; cada Z^1 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico; cada Z^2 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico; cada Z^3 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico; cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; y cada Z^5 es independientemente un aminoácido natural que contiene una cadena lateral hidrófoba.

En algunos modos de realización, los polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2 pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GJTJF(J)₂Y (SEQ ID NO: 276) o GJTJF(J)₂YJ (SEQ ID NO: 277); una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₃GSJ o (J)₅GSJ; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos JRJGJSJY(J)₂FDJ (SEQ ID NO: 278) o JRJGJSY(J)₂FD(J)₃ (SEQ ID NO: 279); una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₉Y o (J)₅Y; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₆S o (J)₂S; y/o una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos (J)₅Y(J)₂T o (J)₃Y(J)₄T; en la que cada J es independientemente un aminoácido natural.

Los polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2 pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos $Z^4FZ^3Z^5SSZ^5$ o $Z^4YZ^3Z^5TDZ^5X$; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGZ⁴Z³Y (SEQ ID NO: 263) o VDPEYZ⁴Z³T (SEQ ID NO: 264); una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QZ¹VZ²Z⁴YZ³SZ⁵WYZ⁵Z²Z⁵ (SEQ ID NO: 265) o AZ¹DZ²Z⁴Z³SPZ⁵Z²Z⁵WG (SEQ ID NO: 266); una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMZ⁵ (SEQ ID NO: 267) o QNINKZ⁵ (SEQ ID NO: 268); una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAZ³ (SEQ ID NO: 269), TYZ³ o YTZ³; y/o una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRRNZ⁵PYZ³ (SEQ ID NO: 270) o CLQZ⁵VNLXZ³ (SEQ ID NO: 271); en la que cada Z^1 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral catiónica a pH fisiológico; cada Z^2 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral aniónica a pH fisiológico; cada Z^3 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral polar no cargada a pH fisiológico; cada Z^4 es independientemente una glicina o alanina; cada Z^5 es independientemente un aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba; y cada X es independientemente leucina o isoleucina.

En algunos modos de realización, los polipéptidos monocatenarios antagonistas del TNFR2 de la invención o la divulgación pueden tener una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23), GYTFTDYX (SEQ ID NO: 257) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24), VDPEYGST (SEQ ID NO: 258) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25), ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26), QNINKY (SEQ ID NO: 260) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias; una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27), TYS, YTS o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a SEQ ID NO: 27; y/o una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRRNYPYT (SEQ ID NO: 28), CLQYVNLXT (SEQ ID NO: 261) o una secuencia de aminoácidos que tiene hasta dos sustituciones aminoacídicas con respecto a estas secuencias.

Los polipéptidos monocatenarios se pueden producir mediante una variedad de técnicas recombinantes y sintéticas, tales como mediante expresión génica recombinante o procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica puede diseñar polinucleótidos que codifiquen, por ejemplo, dos o más de las CDR anteriores enlazadas de forma funcional entre sí en marco para producir un péptido monocatenario continuo que contenga estas CDR. Opcionalmente, las CDR pueden estar separadas por un espaciador, tal como por una región estructural (por ejemplo, una secuencia estructural descrita en el presente documento o una región estructural de una secuencia consenso de línea germinal de un anticuerpo humano) o un conector flexible, tal como un conector de poliglicina o glicina/serina descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando se produce mediante procedimientos de síntesis química, se puede usar opcionalmente la unión química natural como estrategia para la síntesis de péptidos largos (por ejemplo, de más de 50 aminoácidos). Los protocolos de unión química natural son conocidos en la técnica y se han descritos, por ejemplo, por Dawson et al. (Science, 266:776-779, 1994). En las secciones siguientes se proporciona una descripción detallada de las técnicas para la producción de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos.

Ácidos nucleicos y sistemas de expresión

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de

técnicas establecidas. Por ejemplo, se pueden preparar polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención mediante expresión recombinante de uno o más genes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula huésped. Por ejemplo, para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se puede transfectar una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y pesada se expresen en la célula huésped y, opcionalmente, se secreten al medio en el que se cultivan las células huésped, medio del que se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan metodologías estándar de ADN recombinante para obtener genes de cadenas pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Cold Spring Harbor, NY, 1989), *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., Greene Publishing Associates, 1989) y en la patente de EE. UU. n.º 4.816.397.

Vectores para la expresión de polipéptidos antagonistas del TNFR2

Los genomas víricos proporcionan una rica fuente de vectores que se pueden usar para la inserción eficaz de genes exógenos en el genoma de una célula (por ejemplo, una célula eucariota o procariota). Los genomas víricos son vectores en particular útiles para la inserción de genes porque los polinucleótidos contenidos en dichos genomas se incorporan típicamente en el genoma de una célula diana mediante transducción generalizada o especializada. Estos procesos se producen como parte del ciclo de replicación vírica natural y no requieren proteínas o reactivos añadidos para inducir la integración génica. Los ejemplos de vectores víricos incluyen un retrovirus, adenovirus (por ejemplo, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 y Ad48), parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus de ARN de cadena negativa tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y de la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai), virus de ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus de ADN bicatenarios incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus) y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, vaccinia modificado de Ankara (MVA), viruela aviar y viruela del canario). Otros virus útiles para administrar polinucleótidos que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención incluyen virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis, por ejemplo. Ejemplos de retrovirus incluyen: leucosis-sarcoma aviar, virus tipo C, virus tipo B y virus tipo D de mamíferos, grupo HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, tercera edición, B. N. Fields, et al. Eds., Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, 1996). Otros ejemplos incluyen virus de la leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de linfocitos T humana, virus endógeno del babuino, virus de la leucemia del simio Gibbon, virus del mono Mason-Pfizer, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus del sarcoma del simio, virus del sarcoma de Rous y lentivirus. Otros ejemplos de vectores se describen, por ejemplo, en McVey et al., (patente de EE. UU. n.º 5.801.030).

Técnicas de edición del genoma

Además de los vectores víricos, se han desarrollado una variedad de procedimientos adicionales para la incorporación de genes, por ejemplo, aquellos que codifican cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos, polipéptidos monocatenarios, fragmentos monocatenarios variables (scFv), scFv en tándem, dominios Fab, dominios F(ab')₂, diacuerpos y tricuerpos, entre otros, en los genomas de células diana para la expresión de polipéptidos. Uno de dichos procedimientos que se puede usar para incorporar polinucleótidos que codifican polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) en células procariotas o eucariotas incluye transposones. Los transposones son polinucleótidos que codifican enzimas transposasas y contienen una secuencia de polinucleótido o un gen de interés flanqueado por sitios de escisión en las posiciones 5' y 3'. Una vez que un transposón ha sido introducido en una célula, comienza la expresión del gen de la transposasa y da como resultado enzimas activas que escinden el gen de interés del transposón. Esta actividad está mediada por el reconocimiento específico de los sitios de escisión de transposones por parte de la transposasa. En algunos modos de realización, estos sitios de escisión pueden ser repeticiones terminales o repeticiones terminales invertidas. Una vez escindido del transposón, el gen de interés se puede integrar en el genoma de una célula procariota o eucariota mediante escisión catalizada por transposasa de sitios de escisión similares que existen dentro del genoma nuclear de la célula. Esto permite insertar el gen que codifica, por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFR2 o fragmento o dominio del mismo en el ADN nuclear escindido en los sitios de escisión, y la posterior unión de los enlaces fosfodiéster que unen el gen de interés al ADN del genoma de la célula procariota o eucariota completa el proceso de incorporación. En algunos modos de realización, el transposón puede ser un retrotransposón, de modo que el gen que codifica el anticuerpo se transcribe primero a un producto de ARN y, a continuación, se transcribe de forma inversa a ADN antes de su incorporación en el genoma de la célula procariota o eucariota. Los sistemas de transposones ejemplares incluyen el transposón piggybac (descrito en detalle en el documento WO 2010/085699) y el transposón bella durmiente (descrito en detalle en el documento US20050112764).

Otro procedimiento útil para la integración de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) en el genoma de una célula procariota o eucariota es el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR)/Cas, que es un sistema que originalmente evolucionó como un mecanismo de defensa adaptativo en bacterias y arqueas contra la infección por virus. El sistema CRISPR/Cas consiste en secuencias palindrómicas repetidas dentro del ADN plasmídico y una nucleasa Cas9 asociada. Este conjunto de ADN y proteína dirige la escisión del ADN en sitios específicos de una secuencia diana incorporando primero ADN exógeno en los locus CRISPR. Los polinucleótidos que contienen estas secuencias exógenas y los elementos espaciadores repetidos del locus CRISPR se transcriben a su vez en una célula huésped para crear un ARN guía, que posteriormente puede hibridar con una secuencia diana y localizar la nucleasa Cas9 en este sitio. De esta manera, se puede generar la escisión de ADN mediada por Cas9 altamente específica de sitio en un polinucleótido exógeno porque la interacción que pone la cas9 en estrecha proximidad de la molécula de ADN diana se rige por la hibridación ARN:ADN. Como resultado, teóricamente se puede diseñar un sistema CRISPR/Cas para escindir cualquier molécula de ADN diana de interés. Esta técnica se ha aprovechado para editar genomas eucarióticos (Hwang et al., Nat. Biotech., 31:227-229, 2013) y se puede usar como un medio eficaz para la edición de genomas eucarióticos o procarióticos en sitios específicos para escindir el ADN antes de la incorporación de un polinucleótido que codifica un polipéptido anti-TNFR2 de la invención. El uso de CRISPR/Cas para modular la expresión génica se ha descrito en la patente de EE. UU. n.º 8.697.359.

Los procedimientos alternativos para escindir el ADN genómico en sitios específicos antes de la incorporación de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra TNFR2 de la invención incluyen el uso de nucleasas con dedos de zinc y nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN). A diferencia del sistema CRISPR/Cas, estas enzimas no contienen un polinucleótido guía para localizar una secuencia diana específica. En cambio, la especificidad por la diana se controla mediante dominios de unión a ADN dentro de estas enzimas. Las nucleasas con dedos de zinc y TALEN para su uso en aplicaciones de edición del genoma se describen en Urnov et al. (Nat. Rev. Genet., 11:636-646, 2010); y en Joung et al., (Nat. Rev. Mol. Cell. Bio. 14:49-55, 2013). Técnicas adicionales de edición del genoma que se pueden usar para incorporar polinucleótidos que codifican anticuerpos de la invención en el genoma de una célula procariota o eucariota incluyen el uso de meganucleasas ARCUS™ que se pueden diseñar racionalmente para escindir ADN genómico en sitios específicos. El uso de estas enzimas para la incorporación de polinucleótidos que codifican polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) de la invención en el genoma de una célula procariota o eucariota es en particular ventajoso en vista de las relaciones estructura-actividad que se han establecido para dichas enzimas. Por tanto, se pueden modificar meganucleasas monocatenarias en determinadas posiciones de aminoácidos para crear nucleasas que escindan selectivamente el ADN en las localizaciones deseadas. Estas nucleasas monocatenarias se han descrito extensamente, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 8.021.867 y 8.445.251.

Elementos de secuencia de polinucleótidos

Para expresar polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de los mismos) de la invención, se pueden insertar polinucleótidos que codifican cadenas ligeras y pesadas de longitud parcial o completa, o CDR de las mismas, por ejemplo, obtenidas como se describe anteriormente en vectores de expresión de modo que los genes estén enlazados de forma funcional a secuencias de control transcripcional y traduccional. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. Los polinucleótidos que codifican, por ejemplo, el gen de la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo contra TNFR2 se pueden insertar en vectores separados u, opcionalmente, ambos polinucleótidos se pueden incorporar al mismo vector de expresión usando técnicas establecidas descritas en el presente documento o conocidas en la técnica.

Además de los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo (o un polinucleótido que codifica un polipéptido monocatenario o un fragmento de anticuerpo, tal como una molécula scFv), los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión. de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula huésped. El diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar o el nivel de expresión de proteína deseado. Por ejemplo, secuencias reguladoras adecuadas para la expresión de células huésped de mamíferos incluyen elementos víricos que dirigen niveles elevados de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores víricos y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.168.062, la patente de EE. UU. n.º 4.510.245 y la patente de EE. UU. n.º 4.968.615.

Además de los genes de CDR o cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. Un gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido

el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos citotóxicos, tales como G418, puomicina, blasticidina, higromicina o metotrexato, a una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped DHFR" con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418). Para expresar las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo contra TNFR2 o un fragmento de anticuerpo contra TNFR2, el vector o vectores de expresión que contienen polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden transfectar en una célula huésped mediante técnicas estándar.

Polinucleótidos que codifican polipéptidos antagonistas del TNFR2 modificados

En algunos modos de realización, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención) pueden ser similares a TNFRAB1 o TNFRAB2 pero presentan diferencias en la secuencia de una o más CDR. En otros casos, los polipéptidos de la invención pueden ser similares a TNFRAB1 o TNFRAB2 pero presentan diferencias en una o más regiones estructurales. Por ejemplo, se pueden sustituir una o más regiones estructurales de TNFRAB1 o TNFRAB2 por la región estructural de un anticuerpo humano. Las regiones estructurales ejemplares incluyen, por ejemplo, regiones estructurales humanas descritas en el documento US 7.829.086 y regiones estructurales de primates como se describen en el documento EP 1945668. De forma alternativa, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención pueden ser similares a TNFRAB1 o TNFRAB2 pero presentan diferencias en la secuencia de una o más CDR y diferencias en una o más regiones estructurales. Para generar ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos antagonistas del TNFR2, se pueden producir fragmentos de ADN que codifican, por ejemplo, una o más CDR, o al menos una, o ambas, de las regiones variables de la cadena ligera y las regiones variables de la cadena pesada mediante síntesis química (por ejemplo, mediante técnicas de síntesis de polinucleótidos en fase sólida), amplificación génica *in vitro* (por ejemplo, mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa) o mediante replicación del polinucleótido en un organismo huésped. Por ejemplo, se pueden obtener ácidos nucleicos que codifican polipéptidos anti-TNFR2 de la invención mediante amplificación y modificación de ADN de línea germinal o ADNc que codifica secuencias variables de la cadena ligera y pesada para incorporar las CDR de TNFRAB1 o TNFRAB2 en los residuos estructurales de un anticuerpo consenso. En algunos modos de realización, un anticuerpo antagonista de TNFR2 humanizado puede incluir una o más CDR de TNFRAB1, o una variante de las mismas que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen entre una y tres sustituciones aminoácídicas (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de TNFRAB1, y una o más CDR de TNFRAB2 o una variante de las mismas que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con cualquiera de estas CDR o secuencias que contienen entre una y tres sustituciones aminoácídicas (por ejemplo, sustituciones conservadoras o no conservadoras) con respecto a las secuencias de CDR de TNFRAB2. Esto se puede lograr, por ejemplo, realizando mutagénesis de sitio dirigido de ADN de línea germinal o ADNc y amplificando los polinucleótidos resultantes usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con procedimientos establecidos. Las secuencias de ADN de línea germinal para genes de regiones variables de la cadena ligera y pesada humanas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de línea germinal humana "VBASE"; véase también Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991; Tomlinson et al., J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992; y Cox et al., Eur. J. Immunol. 24:827- 836, 1994). Se pueden producir construcciones de ácido nucleico quiméricas que codifican regiones variables de la cadena ligera y pesada humanas que contienen una o más de las CDR de TNFRAB1 y TNFRAB2, por ejemplo, usando técnicas de clonación establecidas conocidas en la técnica. Adicionalmente, se puede sintetizar un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada o ligera de TNFRAB1 o TNFRAB2 y usarse como molde para mutagénesis para generar una variante como se describe en el presente documento usando técnicas de mutagénesis de rutina. De forma alternativa, se puede sintetizar directamente un fragmento de ADN que codifica la variante (por ejemplo, mediante procedimientos establecidos de síntesis química de ácidos nucleicos en fase sólida).

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican CDR o segmentos VH y VL de TNFRAB1, TNFRAB2, relacionados con TNFRAB1 o relacionados con TNFRAB2, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se enlaza de forma funcional a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible.

El ADN aislado que codifica la región V_H de un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa (así como en un gen de cadena pesada de Fab), por ejemplo, enlazando de forma funcional el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica dominios de la región constante de la cadena pesada (CH1, CH2, CH3 y, opcionalmente, CH4). Las secuencias de genes de la región constante de la cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences

of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y, en determinados modos de realización, es una región constante de IgG1. Para un gen de la cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica VH se puede enlazar de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica solo el dominio CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL de un polipéptido anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención se puede convertir en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) enlazando de forma funcional el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de la cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-3242, 1991) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener, por ejemplo, mediante amplificación en una célula procariota o eucariota de un polinucleótido que codifica estas regiones, mediante amplificación por PCR o mediante síntesis química de polinucleótidos. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa (κ) o lambda (λ), pero en determinados modos de realización es una región constante kappa. Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan de forma funcional a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos hidrofílica flexible, tal como la secuencia de aminoácidos (Gly₄Ser)₃, de modo que las secuencias de V_H y V_L se pueden expresar como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_L y V_H unidas por el conector (véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; McCafferty et al., Nature 348:552-554, 1990).

La tecnología de ADN recombinante también se puede usar para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para la unión a TNFR2. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también están abarcadas por los polipéptidos de la invención. Además, se pueden producir polipéptidos bifuncionales (por ejemplo, anticuerpos bifuncionales) en los que una cadena pesada y una ligera derivan de TNFRAB1 y/o TNFRAB2 y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de TNFR2. Dichos anticuerpos se pueden generar, por ejemplo, reticulando una cadena pesada y una cadena ligera de TNFRAB1 y/o TNFRAB2 con una cadena pesada y una cadena ligera de un segundo anticuerpo mediante procedimientos de reticulación química estándar (por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro). Los anticuerpos bifuncionales también se pueden preparar expresando una molécula de ácido nucleico genomanipulada para codificar un anticuerpo bifuncional en una célula procariota o eucariota.

Se pueden producir anticuerpos específicos duales, es decir, anticuerpos que se unen a TNFR2 y a un antígeno diferente usando el mismo sitio de unión, mutando residuos aminoacídicos en las CDR de la cadena ligera y/o de la cadena pesada. En algunos modos de realización, se pueden producir anticuerpos duales específicos que se unen a dos antígenos, tales como TNFR2 y un segundo receptor de superficie celular, mutando residuos aminoacídicos en la periferia del sitio de unión a antígeno (Bostrom et al., Science 323: 1610-1614, 2009). Se pueden preparar anticuerpos funcionales duales expresando un polinucleótido genomanipulado para codificar un anticuerpo específico dual.

También se pueden producir los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 modificados de la invención mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2.ª ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, 111). También se pueden generar anticuerpos variantes usando una plataforma sintética sin células (véase, por ejemplo, Chu et al., Biochemia No. 2, 2001 (Roche Molecular Biologicals)).

Células huésped para la expresión de polipéptidos antagonistas del TNFR2

Es posible expresar los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención en células huésped procariotas o bien eucariotas. En algunos modos de realización, la expresión de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se realiza en células eucariotas, por ejemplo, células huésped de mamífero, para la secreción óptima de un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado. Las células huésped de mamífero ejemplares para expresar los polipéptidos recombinantes (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO DHFR, descritas en Urlaub y Chasin (1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220), usado con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982, Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS, células 293 y células SP2/0. Tipos de células adicionales que pueden ser útiles para la expresión de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos incluyen células bacterianas, tales como células de *E. coli* BL-21(DE3), que se pueden transformar con vectores que contienen ADN exógeno de acuerdo con protocolos

establecidos. Otras células eucariotas que pueden ser útiles para la expresión de polipéptidos incluyen células de levadura, tales como cepas auxotróficas de *S. cerevisiae*, que se pueden transformar y cultivar selectivamente en medios incompletos de acuerdo con procedimientos establecidos conocidos en la técnica. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos (por ejemplo, genes que codifican una o más CDR, una cadena pesada de anticuerpo o una cadena ligera de anticuerpo) en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas estándar. También se pueden usar células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. La invención también incluye procedimientos en los que el procedimiento anterior varía de acuerdo con protocolos establecidos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica la cadena ligera o bien la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo anti-TNFR2 de la presente invención para producir un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo.

Una vez que se ha producido un polipéptido anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) del mismo de la invención mediante expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como un procedimiento útil para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, en particular de afinidad por TNFR2 después de la selección con proteína A o proteína G y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para facilitar la purificación o producir conjugados terapéuticos (véase "Conjugados de anticuerpos" a continuación).

Una vez aislado, un anticuerpo anti-TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden purificar adicionalmente, si se desea, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (véase, por ejemplo, Fisher, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Work and Burdon, eds., Elsevier, 1980)) o mediante cromatografía de filtración en gel, tal como en una columna Superdex™ 75 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia).

Plataformas para la generación y maduración de afinidad de polipéptidos antagonistas anti-TNFR2

Mapeo de epítopos de TNFR2 que promueven el antagonismo del receptor

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención se pueden producir cribando colecciones de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) para seleccionar moléculas funcionales que se pueden unir a epítopos dentro de TNFR2 que promueven selectivamente el antagonismo del receptor en lugar de la activación del receptor. Es posible que los péptidos lineales aislados de la proteína de TNFR2 no adopten las mismas conformaciones tridimensionales que las secuencias peptídicas localizadas dentro de la proteína. TNFR2 proporciona un marco estructuralmente rígido que desvía las conformaciones de fragmentos peptídicos individuales y refuerza estas orientaciones espaciales mediante el establecimiento de contactos intramoleculares (por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, puentes salinos) y mediante el posicionamiento diferencial de diversas regiones para la exposición al disolvente dependiendo de la hidrofilia y lipofilia relativas de estas áreas (Mukai et al., Sci. Signal., 3:ra83-ra83, 2010). La restricción conformacional de un fragmento peptídico dentro del TNFR2 se puede lograr incorporando los residuos aminoacídicos de un epítipo de TNFR2 (por ejemplo, un epítipo que promueve el antagonismo del receptor) en un andamio peptídico estructuralmente preorganizado, tal como un péptido cíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico. Los péptidos cíclicos y policíclicos tales como estos confinan un fragmento peptídico a una conformación tridimensional específica. Esto se puede lograr sintetizando epítopos peptídicos aislados de TNFR2 mediante procedimientos de síntesis química establecidos (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida como se describe en el presente documento) e incorporando residuos de cisteína en la secuencia en las posiciones N y C terminales o en diversas posiciones internas dentro de la cadena peptídica. Puede ser ventajoso incorporar residuos de cisteína que estén químicamente protegidos en el resto tiol con un grupo protector que se pueda eliminar en condiciones diferentes de las usadas para eliminar otros grupos protectores dentro del péptido que se está sintetizando y diferentes de las usadas para ensamblar la cadena peptídica. Los grupos protectores ortogonales ejemplares para el tiol de la cisteína incluyen el grupo 4-metiltrilito y el grupo 4-metoxitritilo, cada uno de los cuales se puede eliminar usando ácido trifluoracético diluido (se describen ejemplos, por ejemplo, en Isidro-Llobet et al., Chem Rev., 109:2455-2504, 2009).

Después de introducir un residuo de cisteína en un fragmento peptídico sintético derivado de un epítipo dentro de TNFR2, se puede ciclar el péptido tratando el péptido con un electrófilo multivalente, tal como un derivado de bis(bromometil) o tris(bromometil)areno. Se pueden usar electrófilos reactivos con tiol multivalentes alternativos, por ejemplo, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono, dibromoalcanos acíclicos y otros (véase, por ejemplo, Jo et al., J. Am. Chem. Soc., 134:17704-17713, 2012). En algunos modos de realización, puede ser ventajoso evitar la participación de un residuo de cisteína en el fragmento peptídico sintético en una reacción de ciclación. Por ejemplo, puede ser deseable sintetizar un péptido policíclico que contenga múltiples residuos de cisteína de modo que solo ciertos tioles de cisteína seleccionados participen en el proceso de reticulación intramolecular. Para evitar la participación no deseada de estos grupos tiol de Cys adicionales en la reacción de acoplamiento, un enfoque sencillo es, por ejemplo, usar Fmoc-Cys(Acm) (Fmoc-acetamidometil-L-cisteína) para la introducción de un residuo de Cys protegido durante el transcurso de la síntesis del péptido. De forma alternativa, se puede usar Fmoc-Cys(StBu)-OH y/o los correspondientes aminoácidos protegidos con t-butiloxicarbonilo (Boc). El grupo Acm o StBu no se elimina durante el transcurso de una reacción normal de desprotección-escisión con TFA, sino que requiere un tratamiento oxidativo (por ejemplo, yodo, I₂) en el caso del grupo Acm o un tratamiento reductor (por ejemplo, β-mercaptoetanol (en exceso) o 1,4-ditiotreitol (en exceso)) en el caso del grupo StBu para obtener la forma sulfhidrilo reducida del péptido, que se puede usar directamente o bien oxidarse posteriormente al péptido cistinilo correspondiente. En un modo de realización, se usa un péptido que contiene al menos un derivado de Cys, tal como Cys(Acm) o Cys(StBu), para permitir la desprotección selectiva de un grupo tiol de Cys. La desprotección selectiva de un grupo tiol de Cys hace que el grupo tiol de Cys esté disponible para reaccionar en un momento deseado, tal como después de completar el ensamblaje de la cadena peptídica y antes de la desprotección de otros residuos dentro del péptido (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/013454).

Como ejemplo, se pueden sintetizar colecciones de péptidos cíclicos y policíclicos que contienen fragmentos individuales aislados de TNFR2 y combinaciones de fragmentos de regiones específicas de TNFR2 mediante técnicas tales como las descritas anteriormente para incorporar residuos de cisteína en diversas posiciones dentro del andamio peptídico y usando diferentes reactivos de reticulación electrófilos (véanse, por ejemplo, el ejemplo 1 y la figura 3, SEQ ID NO: 34-117). Estos péptidos se pueden inmovilizar sobre una superficie sólida y cribar para seleccionar moléculas que se unen a polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) tales como TNFRAB1 o TNFRAB2, usando una plataforma de cribado basada en ELISA que usa procedimientos establecidos. Usando este ensayo, por ejemplo, los péptidos que se unen específicamente a TNFRAB1 y/o TNFRAB2 con alta afinidad contienen por lo tanto residuos dentro de epítopos de TNFR2 que se unen preferentemente a TNFRAB1 y/o TNFRAB2 y estos residuos se pueden reorganizar estructuralmente de modo que se asemejen a las conformaciones del péptido correspondiente en la proteína natural. Se pueden usar los péptidos cíclicos y policíclicos así obtenidos (por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7) para cribar colecciones de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para identificar polipéptidos anti-TNFR2 de la invención. Además, dado que estos péptidos restringidos actúan como sustitutos de epítopos dentro de TNFR2 que promueven el antagonismo del receptor, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos) generados usando esta técnica de cribado se pueden unir a los epítopos correspondientes en TNFR2 y se espera que sean antagonistas de la actividad del receptor.

Cribado de colecciones de polipéptidos antagonistas del TNFR2

Los procedimientos para la el cribado ultrarrápido de colecciones de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) para seleccionar moléculas que se pueden unir a epítopos dentro de TNFR2 (por ejemplo, epítopos presentados por péptidos que tienen la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7) incluyen, sin limitación, técnicas de presentación que incluyen presentación en fagos, presentación en bacterias, presentación en levaduras, presentación en mamíferos, presentación en ribosomas, presentación en ARNm y presentación en ADNc. El uso de la presentación en fagos para aislar ligandos que se unen a moléculas biológicamente relevantes se ha revisado, por ejemplo, en Felici et al. (Biotechnol. Annual Rev. 1:149-183, 1995), Katz (Annual Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45, 1997) y Hoogenboom et al. (Immunotechnology 4:1-20, 1998). Se han construido varias colecciones combinatorias aleatorias de péptidos para seleccionar polipéptidos que se unen a diferentes dianas, por ejemplo, receptores de superficie celular o ADN (revisado por Kay (Perspect. Drug Discovery Des. 2, 251-268, 1995), Kay et al., (Mol. Divers. 1:139-140, 1996)). Se han presentado con éxito proteínas y proteínas multiméricas en fagos como moléculas funcionales (véanse los documentos EP 0349578A, EP 4527839A, EP 0589877A; Chiswell y McCafferty (Trends Biotechnol. 10, 80-84 1992)). Además, se han expresado fragmentos de anticuerpos funcionales (por ejemplo, Fab, Fv monocatenario [scFv]) (McCafferty et al. (Nature 348: 552- 554, 1990), Barbas et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982, 1991), Clackson et al. (Nature 352:624-628, 1991)).

(i) Técnicas de presentación en fagos

Como ejemplo, se pueden usar técnicas de presentación en fagos para cribar colecciones de polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, para seleccionar moléculas funcionales que se pueden unir a péptidos cíclicos o policíclicos que contienen epítomos dentro de TNFR2 que promueven el antagonismo del receptor (por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63). Por ejemplo, se pueden obtener colecciones de polinucleótidos que codifican fragmentos de anticuerpos monocatenarios, tales como fragmentos scFv, que contienen regiones hipervariables aleatorias usando procedimientos establecidos (por ejemplo, síntesis de polinucleótidos en fase sólida o técnicas de PCR propensas a errores, véase McCullum et al. (Meth. Mol. Biol., 634:103-109, 2010)). Estos polinucleótidos aleatorios se pueden incorporar posteriormente en un genoma vírico de modo que las cadenas de anticuerpo aleatorias codificadas por estos genes se expresen en la superficie de fagos filamentosos, por ejemplo, mediante un enlace covalente entre la cadena de anticuerpo y una proteína de cubierta (por ejemplo, proteína de cubierta pIII en la superficie del fago M13). Esto proporciona una conexión física entre el genotipo y el fenotipo de la cadena de anticuerpo. De esta manera, se pueden cribar colecciones de fagos que presentan diversas cadenas de anticuerpo que contienen mutaciones aleatorias en regiones hipervariables para identificar la capacidad de las cadenas de anticuerpos exteriores para unirse a epítomos de TNFR2 (por ejemplo, péptidos que tienen la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7) que están inmovilizados en una superficie mediante procedimientos establecidos. Por ejemplo, péptidos cíclicos como los representados por las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63, que contienen el motivo KCRPG, se pueden unir físicamente a la superficie de una placa de microvaloración formando un enlace covalente entre el péptido y una marca de epítomo (por ejemplo, biotina) e incubando el péptido en pocillos de una placa de microvaloración que se han recubierto previamente con una marca complementaria (por ejemplo, avidina) que une la marca unida al péptido con alta afinidad. Las marcas de epítomo adecuadas incluyen, sin limitación, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, una marca de polihistidina, una marca FLAG, una marca myc, una marca de hemaglutinina (HA) de gripe humana, biotina o estreptavidina. Los péptidos que contienen los epítomos presentados por estas moléculas se pueden inmovilizar en superficies que contienen dichas moléculas complementarias como maltosa, glutatión, un complejo que contiene níquel, un anticuerpo anti-FLAG, un anticuerpo anti-myc, un anticuerpo anti-HA, estreptavidina o biotina, respectivamente. De esta manera, se puede incubar el fago con una superficie que contiene un péptido derivado de TNFR2 inmovilizado durante un tiempo adecuado para permitir la unión del anticuerpo al péptido restringido y en presencia de un sistema tampón apropiado (por ejemplo, uno que contiene concentración de sales y fuerza iónica fisiológicas y se mantiene a pH fisiológico mediante un agente tampón). A continuación, se puede lavar la superficie (por ejemplo, con tampón fosfato que contiene Tween-20 al 0,1 %) para eliminar los fagos que no presentan cadenas de anticuerpo que interactúen con los péptidos derivados de TNFR2 con una afinidad mayor que un valor umbral particular.

La afinidad de los polipéptidos que permanecen después de esta etapa inicial de barrido (es decir, cribado) se puede modular ajustando las condiciones de la etapa de lavado (por ejemplo, incluyendo componentes ligeramente ácidos o básicos o incluyendo otros péptidos derivados de TNFR2 a baja concentración para competir con los péptidos inmovilizados por los sitios de unión a antígeno). De esta manera, la población de fagos que permanecen unidos a las superficies de la placa de microvaloración después de la etapa de lavado se enriquece con fagos que se unen a epítomos peptídicos derivados de TNFR2 que promueven el antagonismo del receptor. Los fagos restante se pueden amplificar a continuación eluyendo los fagos de la superficie que contiene estos péptidos (por ejemplo, alterando el pH ambiental, la fuerza iónica o la temperatura) para disminuir la fuerza de la interacción proteína-proteína. Los fagos aislados se pueden amplificar a continuación, por ejemplo, infectando células bacterianas, y los fagos resultantes se pueden someter opcionalmente a barrido mediante iteraciones adicionales de cribado para enriquecer aún más la población de fagos para aquellos que albergan polipéptidos anti-TNFR2 de mayor afinidad. Después de estas etapas de barrido, se pueden aislar posteriormente los fagos que presentan anticuerpos de alta afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y se pueden secuenciar los genomas de estos fagos para identificar las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos de los anticuerpos codificados. Se pueden usar técnicas de presentación en fagos tales como esta para generar, por ejemplo, cadenas de anticuerpos, tales como fragmentos scFv, fragmentos scFv en tándem y otros fragmentos de unión a antígeno de la invención que se pueden usar como antagonistas del TNFR2. Los protocolos de presentación en fagos ejemplares para la identificación de cadenas de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de las mismas que se unen a un antígeno particular con alta afinidad están bien establecidos y se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.846.892, el documento WO 1997/002342, la patente de EE. UU. n.º 8.846.867 y el documento WO 2007/132917. Se pueden usar técnicas de presentación en fagos similares para generar andamios similares a anticuerpos (por ejemplo, dominios ¹⁰Fn3) de la invención que se unen a epítomos dentro de TNFR2 que promueven el antagonismo del receptor (por ejemplo, epítomos presentados por péptidos con la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63). Se describen protocolos de presentación en fagos ejemplares para la identificación de proteínas de andamio similares a anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2009/086116).

(ii) Técnicas de presentación basadas en células

Otras técnicas de presentación *in vitro* que aprovechan la relación entre el genotipo y el fenotipo de un polipéptido expuesto al disolvente (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) incluyen la presentación en levaduras y bacterias. Las técnicas de presentación en levaduras están establecidas en la técnica y a menudo son ventajosas porque se pueden presentar grandes cantidades de anticuerpos (a menudo hasta 30.000) en la superficie de una célula de levadura individual (véase, por ejemplo, Boder et al. (Nat Biotechnol. 15:553, 1997)). El mayor tamaño de las células de levaduras con respecto a los fagos filamentosos permite usar una estrategia de cribado adicional, ya que se puede usar la citometría de flujo tanto para analizar como para clasificar colecciones de levaduras. Por ejemplo, se pueden usar procedimientos establecidos para generar colecciones de células bacterianas o células de levaduras que expresan polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que contienen regiones hipervariables aleatorias (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.749.501 y el documento US 2013/0085072). Por ejemplo, se pueden preparar grandes colecciones de células de levaduras que expresan polinucleótidos que codifican fragmentos scFv vírgenes usando procedimientos establecidos (de Bruin et al., Nat Biotechnol 17:397, 1999). A continuación, las células de levaduras que expresan estos polinucleótidos se pueden incubar con dos moléculas fluorescentes diferentes durante las etapas de barrido: un tinte que se une a los residuos conservados dentro del anticuerpo y, por tanto, refleja la cantidad de anticuerpo presentado, y otro tinte que emite fluorescencia a una longitud de onda diferente y se une al antígeno y, por tanto, indica la cantidad de antígeno unido. En estos casos, es útil usar un péptido cíclico o policíclico que contenga la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 (y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) que se ha conjugado con una marca de epítipo (por ejemplo, biotina), opcionalmente en un residuo que no se espera que interfiera con la unión anticuerpo-antígeno. Esto permite que localizar un tinte fluorescente marcado con una marca complementaria (por ejemplo, avidina) en el complejo anticuerpo-antígeno. Esto da como resultado una gran flexibilidad y una retroalimentación inmediata sobre el progreso de una selección. Al contrario que en la presentación en fagos, al normalizar los niveles de presentación de anticuerpos, se pueden seleccionar fácilmente anticuerpos con mayores afinidades, en lugar de con mayores niveles de expresión. De hecho, es posible distinguir y clasificar anticuerpos cuyas afinidades difieren en solo dos veces (VanAntwerp y Wittrup (Biotechnol Prog 16:31, 2000)).

(iii) Técnicas de presentación en nucleótidos

Las técnicas de presentación que utilizan la traducción *in vitro* de colecciones de polinucleótidos aleatorios también proporcionan un enfoque potente para generar los anticuerpos anti-TNFR2 de la invención. Por ejemplo, se pueden obtener colecciones de ADN aleatorias que codifican polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que contienen mutaciones dentro de regiones hipervariables designadas, por ejemplo, usando técnicas establecidas de mutagénesis basadas en PCR como se describe en el presente documento. Los polinucleótidos de estas colecciones pueden contener secuencias reguladoras de la transcripción, tales como promotores y secuencias de terminación de la transcripción, y pueden codificar adicionalmente secuencias que incrementan la velocidad de traducción de la construcción de ARNm resultante (por ejemplo, secuencias IRES, UTR 5' y 3', un tramo de poliadenilación, etc.). Estas colecciones de polinucleótidos se pueden incubar en una solución apropiadamente tamponada que contiene ARN polimerasa y nucleósidos trifosfato (NTP) de ARN para permitir la transcripción de las secuencias de ADN en moléculas de ARNm competentes, que posteriormente se pueden traducir por subunidades ribosómicas grandes y pequeñas, moléculas de aminoacil ARNt y factores de iniciación y elongación de la traducción presentes en solución (por ejemplo, usando el kit de síntesis de proteínas *in vitro* PURExpress®, New England Biolabs®). Las modificaciones del ARNm diseñadas pueden permitir que el producto del anticuerpo permanezca unido covalentemente al molde de ARNm mediante un enlace químico a la puromicina (por ejemplo, véase Keefe (Curr. Protoc. Mol. Biol., capítulo 24, unidad 24.5, 2001)). Por tanto, esta relación genotipo-fenotipo se puede usar para seleccionar anticuerpos que se unen a un péptido derivado de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) mediante la incubación de construcciones de fusión ARNm:anticuerpo con un péptido inmovilizado en una superficie y barrido de una manera similar a las técnicas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/072773).

Opcionalmente, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención se pueden generar usando una técnica similar, excepto que el producto polipeptídico se puede unir de forma no covalente al complejo ribosoma-ARNm en lugar de hacerlo de forma covalente por medio de un conector de puromicina. Esta plataforma, conocida como presentación en ribosomas, se ha descrito, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.074.557. De forma alternativa, se pueden generar anticuerpos usando la presentación en ADNc, una técnica análoga a la presentación en ARNm con la excepción de que el ADNc, en lugar del ARNm, se une covalentemente a un producto de anticuerpo por medio de un conector de puromicina. Las técnicas de presentación en ADNc ofrecen la ventaja de poder realizar etapas de barrido en condiciones cada vez más rigurosas, por ejemplo, en condiciones en las que la concentración de sal, la fuerza iónica, el pH y/o la temperatura del entorno se ajustan para cribar anticuerpos con afinidad en particular alta por los péptidos derivados de TNFR2. Esto se debe a la mayor estabilidad natural del ADNc bicatenario con respecto al ARNm monocatenario. Las técnicas de cribado por presentación en ADNc se describen, por ejemplo, en Ueno et al. (Methods Mol. Biol., 805:113-135, 2012).

Además de generar polipéptidos anti-TNFR2 de la invención, las técnicas de presentación *in vitro* (por ejemplo, las descritas en el presente documento y las conocidas en la técnica) también proporcionan procedimientos para mejorar la afinidad de un polipéptido anti-TNFR2 de la invención. Por ejemplo, en lugar de cribar colecciones de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos que contienen regiones hipervariables completamente aleatorias, se pueden cribar colecciones más reducidas de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que presentan mutaciones dirigidas en sitios específicos dentro de regiones hipervariables. Esto se puede lograr, por ejemplo, ensamblando colecciones de polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que codifican mutaciones aleatorias solo en sitios particulares dentro de regiones hipervariables. Estos polinucleótidos se pueden expresar a continuación, por ejemplo, en fagos filamentosos, células bacterianas, células de levaduras, células de mamíferos o *in vitro* usando, por ejemplo, técnicas de presentación en ribosomas, presentación en ARNm o presentación en ADNc para cribar polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a epítopos de TNFR2 (por ejemplo, péptidos que contienen la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) con una afinidad de unión mejorada. La presentación en levaduras es en particular adecuada para la maduración de afinidad y se ha usado previamente para mejorar la afinidad de un anticuerpo monocatenario con una K_D de 48 fM (Boder et al. (Proc Natl Acad Sci USA 97:10701, 2000)).

Técnicas *in vitro* adicionales que se pueden usar para la generación y maduración de afinidad de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención incluyen el cribado de colecciones combinatorias de polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para seleccionar moléculas funcionales que se puedan unir específicamente a péptidos derivados de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, tales como SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63). Se pueden obtener colecciones combinatorias de polipéptidos, tales como colecciones de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, mediante expresión de polinucleótidos que codifican regiones hipervariables aleatorias de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una célula eucariota o procariota. Esto se puede lograr, por ejemplo, usando técnicas de expresión génica descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Se pueden purificar mezclas heterogéneas de anticuerpos, por ejemplo, mediante selección con proteína A o proteína G, cromatografía en columna por tamaño, centrifugación, solubilidad diferencial y/o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Las colecciones de colecciones combinatorias así obtenidas se pueden cribar, por ejemplo, incubando una mezcla heterogénea de estos anticuerpos con un péptido derivado de TNFR2 que se ha inmovilizado en una superficie (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 inmovilizado en la superficie de una resina en fase sólida o en un pocillo de una placa de microvaloración) durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión anticuerpo-antígeno. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que no se unen se pueden eliminar lavando la superficie con un tampón apropiado (por ejemplo, una solución tamponada a pH fisiológico (aproximadamente 7,4) y que contiene concentraciones de sales y fuerza iónica fisiológicas, y que contiene opcionalmente un detergente, tal como TWEEN-20). Los anticuerpos que permanecen unidos se pueden detectar posteriormente, por ejemplo, usando un protocolo de detección basado en ELISA (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.661.445).

Técnicas adicionales para cribar colecciones combinatorias de polipéptidos para seleccionar aquellos que se unen específicamente a péptidos derivados de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, tales como SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) incluyen el cribado de colecciones de una microesfera para un compuesto de polipéptidos monocatenarios o fragmentos de anticuerpos. Los polipéptidos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos se pueden sintetizar químicamente en una microesfera sólida (por ejemplo, usando protocolos establecidos de síntesis de péptidos en fase sólida de división y combinación) compuesta de un material hidrófilo hinchable en agua de modo que cada microesfera presente un único fragmento de anticuerpo. A continuación, se pueden incubar mezclas de microesferas heterogéneas con un péptido derivado de TNFR2 que se marca opcionalmente con un resto detectable (por ejemplo, un tinte fluorescente) o que se conjuga con una marca de epítopo (por ejemplo, biotina, avidina, marca FLAG, marca HA) que posteriormente se puede detectar mediante tratamiento con una marca complementaria (por ejemplo, avidina, biotina, anticuerpo anti-FLAG, anticuerpo anti-HA, respectivamente). Se pueden identificar las microesferas que contienen fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a un péptido derivado de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, tales como SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) analizando las propiedades fluorescentes de las microesferas después de la incubación con un antígeno marcado fluorescentemente o una marca complementaria (por ejemplo, mediante microscopía de fluorescencia confocal o mediante clasificación de microesferas activadas por fluorescencia; véase, por ejemplo, Muller et al. (J. Biol. Chem., 16500-16505, 1996)). Por tanto, las microesferas que contienen fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a péptidos derivados de TNFR2 se pueden separar de aquellas que no contienen fragmentos de anticuerpos de alta afinidad. La secuencia de un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un péptido derivado de TNFR2 se puede determinar mediante técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, degradación de Edman, espectrometría de masas en tándem, espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz

con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), resonancia magnética nuclear (RMN) y electroforesis en gel 2D, entre otras (véase, por ejemplo, el documento WO 2004/062553).

Cribados negativos de polipéptidos

Además de los procedimientos descritos anteriormente para cribado de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un epítipo derivado de TNFR2 humano que contiene el motivo KCR o KCRPG, también se pueden realizar cribados negativos para eliminar polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que también se pueden unir a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG. Por ejemplo, se pueden cribar mezclas de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos aislados como resultado de cualquiera de las técnicas de cribado descritas anteriormente para seleccionar polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que también se unen específicamente a un péptido derivado de TNFR2 humano que contiene el motivo KCSPG, tal como un péptido que contiene los residuos 48-67 de SEQ ID NO: 7 (QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC, SEQ ID NO: 18). Esto se puede lograr usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente o variaciones de los mismos, por ejemplo, de modo que los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se criban sean aquellos que se identificaron previamente como que se pueden unir específicamente a un péptido que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG (por ejemplo, al menos la secuencia KCR). Las técnicas ejemplares útiles para un cribado negativo incluyen las descritas anteriormente o conocidas en la técnica, tales como presentación en fagos, presentación en levaduras, presentación en bacterias, presentación en ribosomas, presentación en ARNm, presentación en ADNc o cribados de colecciones combinatorias basadas en superficies (por ejemplo, en un formato ELISA). Esta técnica de cribado representa una estrategia útil para identificar polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2, ya que se ha demostrado que los polipéptidos que se pueden unir a epítopos de TNFR2 que contienen la secuencia KCSPG y uno o más residuos de la secuencia KCRPG carecen de, o tienen significativamente reducida la, actividad antagonista.

Inmunización de un mamífero no humano

Otra estrategia que se puede usar para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención incluye la inmunización de un mamífero no humano. Ejemplos de mamíferos no humanos que se pueden inmunizar para producir anticuerpos antagonistas del TNFR2 y fragmentos de los mismos de la invención incluyen conejos, ratones, ratas, cabras, cobayas, hámsters, caballos y ovejas, así como primates no humanos. Por ejemplo, en la técnica se conocen procedimientos establecidos para inmunizar primates (véase, por ejemplo, el documento WO 1986/6004782). La inmunización representa un procedimiento sólido de producción de anticuerpos monoclonales aprovechando la especificidad antigénica de los linfocitos B. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante el procedimiento de Kohler-Millstein (descrito, por ejemplo, en el documento EP 0110716), en el que células del bazo de un animal no humano (por ejemplo, un primate) inmunizadas con un péptido que presenta un antígeno derivado de TNFR2 que promueve el antagonismo del receptor (por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, tales como SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63). Un linfocito B clonalmente expandido producido mediante inmunización puede aislarse del suero del animal y posteriormente fusionarse con una célula de mieloma para formar un hibridoma. Los hibridomas son agentes en particular útiles para la producción de anticuerpos, ya que estas células inmortalizadas pueden proporcionar un suministro duradero de un anticuerpo específico de antígeno. Los anticuerpos de dichos hibridomas se pueden aislar posteriormente usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, purificando los anticuerpos del medio de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad, usando reactivos tales como proteína A o proteína G.

Conjugados de polipéptidos antagonistas del TNFR2

Antes de la administración de polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano), puede ser deseable conjugar el polipéptido (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) con una segunda molécula, por ejemplo, para modular la actividad del polipéptido *in vivo*. Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos antagonistas del TNFR2 se pueden conjugar con otras moléculas en el extremo N o bien en el extremo C de una cadena ligera o pesada del polipéptido usando una cualquiera de una variedad de estrategias de conjugación establecidas que son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de pares de grupos funcionales reactivos que se pueden usar para unir covalentemente un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista del TNFR2 a otra molécula incluyen, sin limitación, pares de tioles, ácidos carboxílicos y grupos amino, cetonas y grupos amino, aldehídos y grupos amino, tioles y restos alfa,beta-insaturados (tales como maleimidas o deshidroalanina), tioles y alfa-haloamidas, ácidos carboxílicos e hidracidas, aldehídos e hidracidas, y cetonas e hidracidas.

Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos antagonistas del TNFR2 se pueden acoplar covalentemente directamente a otra molécula mediante conjugación química como se describe. De forma alternativa, las proteínas de fusión que contienen polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los

mismos antagonistas del TNFR2 se pueden expresar de forma recombinante a partir de una célula (por ejemplo, una célula eucariota o una célula procariota). Esto se puede lograr, por ejemplo, incorporando un polinucleótido que codifica la proteína de fusión en el genoma nuclear de una célula (por ejemplo, usando técnicas descritas en el presente documento o conocidas en la técnica). Opcionalmente, los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención se pueden unir a una segunda molécula formando un enlace covalente entre el anticuerpo y un conector. A continuación, se puede conjugar este conector posteriormente con otra molécula, o se puede conjugar el conector con otra molécula antes de la unión al polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo anti-TNFR2. Ejemplos de conectores que se pueden usar para la formación de un conjugado incluyen conectores polipeptídicos, tales como los que contienen aminoácidos naturales o no naturales. En algunos modos de realización, puede ser deseable incluir D-aminoácidos en el conector, ya que estos residuos no están presentes en proteínas naturales y, por tanto, son más resistentes a la degradación por proteasas endógenas. Se pueden preparar proteínas de fusión que contienen conectores polipeptídicos usando técnicas de síntesis química, tales como las descritas en el presente documento, o mediante expresión recombinante de un polinucleótido que codifica la proteína de fusión en una célula (por ejemplo, una célula procariota o eucariota). Los conectores se pueden preparar usando una variedad de estrategias que son bien conocidas en la técnica y, dependiendo de los componentes reactivos del conector, se pueden escindir mediante hidrólisis enzimática, fotólisis, hidrólisis en condiciones ácidas, hidrólisis en condiciones básicas, oxidación, reducción de disulfuro, escisión nucleofílica o escisión organometálica (Lerich et al., Bioorg. Med. Chem., 20:571-582, 2012).

Conjugados fármaco-polipéptido

Un polipéptido antagonista del TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención se puede además conjugar a, mezclar con o administrar por separado de un agente terapéutico, tal como una molécula citotóxica. Los conjugados de la invención pueden ser aplicables al tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la proliferación celular anómala, tal como un cáncer descrito en el presente documento. Los agentes citotóxicos ejemplares que se pueden conjugar a, mezclar con o administrar por separado de un polipéptido antagonista del TNFR2 incluyen, sin limitación, agentes antineoplásicos tales como: acivicina; aclarubicina; clorhidrato de acodazol; acronina; adozelesina; adriamicina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; a. acetato de metantrona; aminoglutetimida; amsacrino; anastrozol; antramicina; asparaginasa; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; clorhidrato de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódico; bropirimina; busulfán; cactinomicina; calusterona; camptotecina; caracamida; carbetímero; carboplatino; carmustina; clorhidrato de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucilo; cirolemicina; cisplatino; cladribina; combretastatina a-4; mesilato de crinatalol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; dactinomicina; clorhidrato de daunorrubicina; daunomicina; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diazicuona; docetaxel; dolasatinas; doxorubicina; clorhidrato de doxorubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; clorhidrato de eflornitina; elipticina; elsamitrucina; enloplatino; enpromate; epipropidina; clorhidrato de epirubicina; erbulozol; clorhidrato de esorubicina; estramustina; estramustina fosfato sódico; etanidazol; aceite etiodizado con I-131; etopósido; fosfato de etopósido; etoprina; clorhidrato de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracilo; 5-FdUMP; flurocitabina; fosquidona; fostriecina sódica; gemcitabina; clorhidrato de gemcitabina; oro Au-198; homocamptotecina; hidroxiurea; clorhidrato de idarrubicina; ifosfamida; ilmofosina; interferón alfa-2a; interferón alfa-2b; interferón alfa-n1; interferón alfa-n3; interferón beta-i a; interferón gamma-i b; ipropplatino; clorhidrato de irinotecán; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de liarozol; lometrexol sódico; lomustina; clorhidrato de losoxantrona; masoprocól; maitansina; clorhidrato de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalán; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; metotrexato sódico; metoprina; meturedapa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; clorhidrato de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamina; ormaplatino; oxisurano; paclitaxel; pegaspargasa; peliomicina; pentamustina; sulfato de peploicina; perfosfamida; pipobromán; piposulfán; clorhidrato de piroxantrona; plicamicina; plomestano; porfímero sódico; porfiromicina; prednimustina; clorhidrato de procarbazona; puomicina; clorhidrato de puomicina; pirazofurina; rizoxina; rizoxina d; riboprina; rogletimida; safingol; clorhidrato de safingol; semustina; simtrazeno; esparfosato sódico; esparsomicina; clorhidrato de espirogermanio; espiromustina; espiroplatino; estreptonigrina; estreptozocina; cloruro de estroncio Sr-89; sulfofenur; talisomicina; taxano; taxoide; tecogalán sódico; tegafur; clorhidrato de teloxantrona; temoporfina; tenipósido; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; timitaq; tiazofurina; tirapazamina; tomudex; top53; clorhidrato de topotecán; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; glucuronato de trimetrexato; triptorelina; clorhidrato de tubulozol; mostaza de uracilo; uredepa; vaporetina; verteporfina; vinblastina; sulfato de vinblastina; vincristina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; sulfato de vinglicinato; sulfato de vinleurosina; tartrato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatino; zinostatina; clorhidrato de zorubicina; 2-clorodesoxiadenosina; 2'-desoxiformicina; 9-aminocamptotecina; raltitrexed; ácido N-propargil-5,8-didesazafólico; 2-cloro-2'-arabino-fluoro-2'-desoxiadenosina; 2-cloro-2'-desoxiadenosina; anisomicina; tricostatina A; hPRL-G129R; CEP-751; linomida; mostaza de azufre; mostaza nitrogenada (mecloretamina); ciclofosfamida; melfalán; clorambucilo; ifosfamida; busulfán; N-metil-N-nitrosourea (MNU); N,N'-bis(2-cloroetil)-N-nitrosourea (BCNU); N-(2-cloroetil)-N'-ciclohexil-N-nitrosourea (CCNU); N-(2-cloroetil)-N'-(trans-4-metilciclohexil)-N-nitrosourea (MeCCNU); N-(2-cloroetil)-N'-

(dietil)etilfosfonato-N-nitrosoare (fotemustina); estreptoizotocina; diacarbazina (DTIC); mitozolomida; temozolomida; tiotepa; mitomicina C; AZQ; adozelesina; cisplatino; carboplatino; ormaplatino; oxaliplatino; C1-973; DWA 2114R; JM216; JM335; bis(platino); tomudex; azacitidina; citarabina; gemcitabina; 6-mercaptopurina; 6-tioguanina; hipoxantina; tenipósido 9-amino camptotecina; topotecán; CPT-11; doxorubicina; daunomicina; epirubicina; darrubicina; mitoxantrona; losoxantrona; dactinomicina (actinomicina D); amsacrina; pirazoloacridina; retinol todo trans; 14-hidroxi-retro-retinol; ácido retinoico todo-trans; N-(4-hidroxifenil)retinamida; ácido 13-cis-retinoico; 3-metil-TTNEB; ácido 9-cis-retinoico; fludarabina (2-F-ara-AMP); o 2-clorodesoxiadenosina (2-Cda).

Otros compuestos terapéuticos que se pueden conjugar a, mezclar con o administrar por separado de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo antagonista del TNFR2 de la invención para tratar, evitar o estudiar la progresión de una enfermedad asociada con proliferación celular anómala incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos tales como 20-pi-1,25-dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; acilfulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; amsacrino; anagrelida; anastrozol; andrografólido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína morfogenética-1 antidorsalizante; antiandrógeno, carcinoma de próstata; antiestrógeno; antineoplastón; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilestaurosoprina; derivados betalactámicos; beta-aletina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bleomicina A2; bleomicina B2; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina (por ejemplo, 10-hidroxi-camptotecina); IL-2 de la ; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartílago; carzelesina; inhibidores de caseína cinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfofato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemnina B; 2'-desoxicoformicina (DCF); deslorelinea; dexifosfamida; dextrazoxano; dexverapamilo; diazicuona; didemina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil espiromustina; discodermolida; docosanol; dolasetrón; doxifluridina; droloxifeno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epotilonas (A, R = H; B, R = Me); epitilonas; epristerida; análogo de estramustina; agonistas de estrógenos; antagonistas de estrógenos; etanidazol; etopósido; etopósido 4'-fosfato (etopofos); exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelaestina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirélix; inhibidores de gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; homoharringtonina (HHT); hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilomofosina; ilomastato; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorubicina; ipomeanol; irinotecán; iroplac; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalaalida F; triacetato de lamelarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentiano; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa leucocitario; leuprolida + estrógeno + progesterona; leuporelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipófilos de platino; lisoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxorribina; lurtotecán; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspina; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogarilo; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN bicatenario desemparejado; mitracina; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos mitotóxica-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular sk de miobacterias; mopidamol; inhibidor del gen de resistencia a múltiples fármacos; tratamiento basado en supresores de tumores múltiples 1; agente antineoplásico mostaza; micaperóxido B; extracto de pared celular de micobacterias; miriaporona; N-acetilidinalina; benzamidas N-sustituídas; nafarelinea; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridrónico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; antioxidante nitróxido; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor de citocinas orales; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxaunomicina; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrónico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargasa; peldesina; pentosano polisulfato de sodio; pentostatina; pentozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilífico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de fosfatasa; picibanilo; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; podofilotoxina; porfímero sódico; porfiromicina; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores del proteasoma; modulador inmunológico basado en proteína A; inhibidor de la proteína cinasa C; inhibidores de la proteína cinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de

raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores de ras farnesil proteína transferasa; inhibidores de ras; inhibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de renio Re-186; rizoxina; ribozimas; retinamida RII; rogletimida; rohitukina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxilo; safingol; saintopina; SarCNU; sarcositol A; sargramostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos sentido; inhibidores de transducción de señales; moduladores de transducción de señales; proteína de unión a antígeno monocatenaria; sizofirán; sobuzoxano; borocaptato de sodio; fenilacetato de sodio; solverol; proteína de unión a somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiostatina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de células madre; estipiamida; inhibidores de estromelina; sulfinosina; antagonista del péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glucosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metioduro de tamoxifeno; taumustina; tazaroteno; tecogalán sódico; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; teniposida; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; mimético de trombopoyetina; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinano; hormona estimulante de la tiroides; etil etiopurpurina de estaño; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topotecán; toposentina; toremifeno; factor de células madre totipotentes; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; tricitribina; trimetrexato; triptorelina; triptisetón; turosterida; inhibidores de tirosina cinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor de urocina; vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdines; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; y zinostatina estimalámero.

Polipéptidos anti-TNFR2 marcados

En algunos modos de realización, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 se pueden conjugar con otra molécula (por ejemplo, una marca de epítipo) para el propósito de purificación o detección. Ejemplos de dichas moléculas que son útiles en la purificación de proteínas incluyen aquellas que presentan epítopos estructurales que pueden ser reconocidos por una segunda molécula. Esta es una estrategia común que se emplea en la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad, en la que una molécula se inmoviliza sobre un soporte sólido y se expone a una mezcla heterogénea que contiene una proteína diana conjugada con una molécula que se puede unir al compuesto inmovilizado. Ejemplos de moléculas de marca de epítipo que se pueden conjugar con polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos antagonistas del TNFR2 para los propósitos de reconocimiento molecular incluyen, sin limitación, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, una marca de polihistidina, una marca FLAG, una marca myc, una marca de hemaglutinina (HA) de gripe humana, biotina, estreptavidina. Los conjugados que contienen los epítopos presentados por estas moléculas pueden ser reconocidos por dichas moléculas complementarias como maltosa, glutatión, un complejo que contiene níquel, un anticuerpo anti-FLAG, un anticuerpo anti-myc, un anticuerpo anti-HA, estreptavidina o biotina, respectivamente. Por ejemplo, se puede purificar un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista del TNFR2 de la invención que se ha conjugado con una marca de epítipo a partir de una mezcla compleja de otras proteínas y biomoléculas (por ejemplo, ADN, ARN, carbohidratos, fosfolípidos, etc.) tratando la mezcla con una resina de fase sólida que contiene una molécula complementaria que puede reconocer y unirse selectivamente a la marca de epítipo del anticuerpo antagonista anti-TNFR2 o fragmento del mismo. Ejemplos de resinas de fase sólida incluyen microesferas de agarosa, que son compatibles con purificaciones en solución acuosa.

Un polipéptido antagonista del TNFR2 de la invención también se puede acoplar covalentemente a una molécula fluorescente, por ejemplo, para detectar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante fluorimetría y/o mediante visualización directa usando microscopía de fluorescencia. Moléculas fluorescentes ejemplares que se pueden conjugar con polipéptidos de la invención incluyen proteína fluorescente verde, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente roja, ficoeritrina, alofocianina, hoescht, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), yoduro de propidio, fluoresceína, cumarina, rodamina, tetrametilrodamina y cianina. Ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes adecuadas para la conjugación con polipéptidos de la invención son bien conocidos en la técnica y se han descrito en detalle, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 7.417.131 y 7.413.874.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 que contienen una molécula fluorescente son en particular útiles para monitorizar las propiedades de localización en la superficie celular de polipéptidos, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención. Por ejemplo, se pueden exponer células de mamífero cultivadas (por ejemplo, linfocitos T-reg) a polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención que se han conjugado covalentemente con una molécula fluorescente y posteriormente analizar estas células usando células técnicas de microscopía de fluorescencia convencionales conocidas en la técnica. La microscopía de fluorescencia confocal es un procedimiento en particular potente para determinar la localización en la superficie celular de polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos antagonistas anti-TNFR2, ya que se pueden analizar planos individuales de una célula para distinguir anticuerpos o fragmentos de los mismos que se han internalizado en el interior de una célula, por ejemplo, mediante endocitosis mediada por receptores, de aquellos que están unidos a la cara externa de la membrana celular. Además, las células se pueden tratar con anticuerpos antagonistas del TNFR2 conjugados con una molécula fluorescente que emite luz visible de una longitud de onda particular (por ejemplo, fluoresceína,

que emite fluorescencia a aproximadamente 535 nm) y una molécula fluorescente adicional que se conoce que se localiza en un sitio particular en la superficie de los linfocitos T-reg y que emite fluorescencia a una longitud de onda diferente (por ejemplo, una molécula que se localiza en CD25 y que emite fluorescencia a aproximadamente 599 nm). Los patrones de emisión resultantes se pueden visualizar mediante microscopía de fluorescencia confocal y las imágenes obtenidas a estas dos longitudes de onda se pueden fusionar para revelar información sobre la localización del polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo antagonista del TNFR2 sobre la superficie celular de T-reg con respecto a otros receptores.

También se pueden incorporar proteínas bioluminiscentes en una proteína de fusión con los propósitos de detectar y visualizar un polipéptido antagonista anti-TNFR2. Las proteínas bioluminiscentes, tales como luciferasa y eucorina, emiten luz como parte de una reacción química con un sustrato (por ejemplo, luciferina y coelenterazina). Proteínas bioluminiscentes ejemplares adecuadas para su uso como una secuencia de diagnóstico y procedimientos para su uso se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.292.658, 5.670.356, 6.171.809 y 7.183.092. Los polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos antagonistas del TNFR2 marcados con proteínas bioluminiscentes son una herramienta útil para la detección de anticuerpos de la invención después de un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, la presencia de un anticuerpo antagonista del TNFR2 que se ha conjugado con una proteína bioluminiscente se puede detectar entre una mezcla compleja de proteínas adicionales separando los componentes de la mezcla usando procedimientos de electroforesis en gel conocidos en la técnica (por ejemplo, análisis en gel natural), y posteriormente transfiriendo las proteínas separadas a una membrana para realizar una inmunoelectrotransferencia. La detección del anticuerpo antagonista del TNFR2 entre la mezcla de otras proteínas se puede lograr tratando la membrana con un sustrato de luciferasa apropiado y posteriormente visualizando la mezcla de proteínas en una película usando protocolos establecidos.

Los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos y fragmentos de los mismos) de la invención también se pueden conjugar con una molécula que comprende un núcleo radiactivo, de modo que un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se puede detectar analizando el patrón de emisión radiactiva del núcleo. De forma alternativa, un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento del mismo se puede modificar directamente incorporando un núcleo radiactivo dentro del anticuerpo durante la preparación de la proteína. Se pueden incorporar isótopos radiactivos de metionina (^{35}S), nitrógeno (^{15}N) o carbono (^{13}C) en anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención, por ejemplo, cultivando bacterias en medios que se han complementado con nutrientes que contienen estos isótopos. Opcionalmente, se pueden incorporar derivados de tirosina que contienen un halógeno radiactivo en un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento del mismo, por ejemplo, cultivando células bacterianas en medios complementados con tirosina radiomarcada. Se ha demostrado que la tirosina funcionalizada con un halógeno radiactivo en la posición C2 del sistema fenólico se incorpora rápidamente en cadenas polipeptídicas en elongación usando enzimas de traducción endógenas *in vivo* (patente de EE. UU. n.º 4.925.651). Los halógenos incluyen flúor, cloro, bromo, yodo y astato. Además, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de los mismos se pueden modificar después del aislamiento y la purificación del cultivo celular funcionalizando los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención con un isótopo radiactivo. Los halógenos representan una clase de isótopos que se pueden incorporar fácilmente a una proteína purificada mediante sustitución aromática en tirosina o triptófano, por ejemplo, por medio de la reacción de uno o más de estos residuos con una especie de halógeno electrófila. Ejemplos de isótopos de halógeno radiactivos incluyen ^{18}F , ^{75}Br , ^{77}Br , ^{122}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{129}I , ^{131}I o ^{211}At .

Otra estrategia alternativa para la incorporación de un isótopo radiactivo es la unión covalente de un grupo quelante al polipéptido antagonista anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo). Los grupos quelantes se pueden acoplar covalentemente a un polipéptido antagonista del TNFR2 mediante la unión a un grupo funcional reactivo, tal como un tiol, grupo amino, alcohol o ácido carboxílico. Los grupos quelantes se pueden modificar a continuación para contener cualquiera de una variedad de radioisótopos metálicos, incluyendo, sin limitación, núclidos radiactivos tales como ^{125}I , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{169}Yb , ^{186}Re , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{77}As , ^{72}As , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi o ^{225}Ac .

En algunos modos de realización, puede ser deseable conjugar covalentemente los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención con un grupo quelante que se pueda unir a un ion metálico de elementos pesados o iones de tierras raras, tales como Gd^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} o Cr^{2+} . Los conjugados que contienen grupos quelantes que están coordinados con dichos metales paramagnéticos son útiles en aplicaciones de formación de imágenes de RMN. Los metales paramagnéticos incluyen, pero no se limitan a, cromo (III), manganeso (II), hierro (II), hierro (III), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), praseodimio (III), neodimio (III), samario (III), gadolinio (III), terbio (III), disprosio (III), holmio (III), erbio (III) e iterbio (III). De esta manera, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 se pueden detectar mediante espectroscopia de RMN. Por ejemplo, se pueden administrar anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de los mismos conjugados con grupos quelantes unidos a iones paramagnéticos a un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano) para monitorizar la distribución del anticuerpo después de la administración. Esto se puede lograr mediante la administración del anticuerpo a un paciente mediante cualquiera de las vías de administración descritas en el presente documento, tales como por vía intravenosa, y analizando posteriormente la localización del anticuerpo administrado registrando una RMN del paciente de acuerdo con los protocolos establecidos.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) se pueden conjugar adicionalmente con otras moléculas con el propósito de mejorar la solubilidad y estabilidad de la proteína en solución acuosa. Ejemplos de dichas moléculas incluyen PEG, PSA, seroalbúmina bovina (BSA) y seroalbúmina humana (HSA), entre otras. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo antagonista del TNFR2 o un fragmento del mismo con restos de carbohidratos para eludir la detección del anticuerpo o fragmento del mismo por parte del sistema inmunitario del paciente que recibe el tratamiento. Este procedimiento de hiperglicosilación reduce la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas al inhibir estéricamente la interacción de la proteína con los receptores de linfocitos B en circulación. De forma alternativa, se pueden conjugar anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de los mismos con moléculas que evitan la eliminación del suero humano y mejoran el perfil farmacocinético de los anticuerpos de la invención. Las moléculas ejemplares que se pueden conjugar o insertar dentro de anticuerpos anti-TNFR2 o fragmentos de los mismos de la invención para atenuar la eliminación y mejorar el perfil farmacocinético de estos anticuerpos y fragmentos incluyen epítomos de unión al receptor de rescate. Estos epítomos se encuentran dentro de la región Fc de una inmunoglobulina IgG y se ha demostrado que se unen a los receptores de Fc y prolongan la semivida del anticuerpo en el suero humano. La inserción de epítomos de unión al receptor de rescate en anticuerpos anti-TNFR2 o fragmentos de los mismos se puede lograr, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.739.277.

Polipéptidos antagonistas del TNFR2 modificados

Además de la conjugación con otros agentes terapéuticos y marcadores para identificación o visualización, los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención también se pueden modificar para mejorar su perfil farmacocinético, estabilidad biofísica o capacidad inhibidora. Por ejemplo, cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-TNFR2 o fragmento del mismo se puede sustituir por un aminoácido isostérico o isoeléctrico (por ejemplo, serina) para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. Por el contrario, se pueden añadir enlaces cistina al anticuerpo o fragmento del mismo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv). Esto se puede lograr, por ejemplo, alterando un polinucleótido que codifica las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o un polinucleótido que codifica un fragmento de anticuerpo para codificar uno o más pares adicionales de residuos de cisteína que pueden formar enlaces disulfuro en condiciones oxidativas para reforzar la estructura terciaria del anticuerpo (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.422.899).

Otra modificación útil que se puede preparar en los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención incluye alterar el perfil de glucosilación de estos anticuerpos y fragmentos de los mismos. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante sustitución, inserción o delección de aminoácidos en un anticuerpo antagonista del TNFR2 para insertar o eliminar un sitio de glucosilación. La glucosilación de anticuerpos se produce típicamente de forma unida a N o unida a O. La glucosilación unida a N es un proceso con el que la unión de un resto de carbohidrato a un anticuerpo se produce en la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de aminoácidos consenso para glucosilación unida a N incluyen las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina (NXS) y asparagina-X-treonina (NXT), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. La inserción de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFR2) crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina también son sustratos competentes para la formación de glucósidos. La adición de sitios de glucosilación a un anticuerpo anti-TNFR2 se puede lograr por tanto alterando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo (por ejemplo, usando técnicas de expresión recombinante como se describe en el presente documento) de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente para promover la glucosilación unida a N, o uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original generan una glucosilación unida a O (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.422.899).

En casos alternativos, puede ser deseable modificar el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones aminoacídicas en una región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc de un anticuerpo anti-TNFR2 o fragmento del mismo (por ejemplo, mediante técnicas de expresión recombinante como se describe en el presente documento) para facilitar la formación adicional de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico por tanto generado puede tener una restricción conformacional incrementada, lo que puede promover una mejorada capacidad de internalización y/o una incrementada destrucción celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada usando reticulantes heterobifuncionales como se describe, por ejemplo, en Wolff et al. (Canc. Res., 53:2560-2565, 1993). De forma alternativa, se puede genomanipular un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y que, por lo tanto, pueda tener capacidades potenciadas de lisis del complemento y ADCC (véase Stevenson et al. (Anti-Canc. Drug Des., 3:219-230, 1989)).

La semivida en suero de los polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se puede mejorar en algunos modos de realización incorporando modificaciones de un aminoácido más, tales como alterando la región CH1 o CL del dominio Fab para introducir un motivo de receptor de rescate, por ejemplo, el que se encuentra en los dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG. Dichas alteraciones se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046 y la patente de EE. UU. n.º 6.121.022. También se pueden preparar modificaciones estructurales adicionales para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo o fragmento del mismo o para reducir o eliminar epítomos de linfocitos T que residen en el mismo, como se describe, por ejemplo, en el documento US2003/0153043.

Procedimientos de tratamiento

Procedimientos de tratamiento de trastornos de proliferación celular

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención son agentes terapéuticos útiles para su uso en el tratamiento de una amplia gama de cánceres y trastornos de proliferación celular. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) se pueden administrar a un sujeto mamífero, tal como un ser humano, que padece un trastorno de proliferación celular, tal como cáncer, por ejemplo, para potenciar la eficacia de la respuesta inmunitaria adaptativa contra las células cancerosas diana. En particular, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se pueden administrar a un sujeto mamífero, tal como un ser humano, para reducir o inhibir el crecimiento y activación de linfocitos T-reg, lo que permite localizar los linfocitos T infiltrantes de tumores en células que presentan antígenos asociados a tumores y promover la citotoxicidad. Además, los polipéptidos de la invención pueden crear sinergia con las plataformas existentes de tratamientos con linfocitos T adoptivos, ya que una de las limitaciones de la eficacia de esta estrategia ha sido la dificultad de prolongar la citotoxicidad de los linfocitos T reactivos a tumores después de la infusión en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano). Los polipéptidos de la invención también pueden promover la actividad de los linfocitos T alogénicos, que pueden expresar proteínas MHC exógenas y pueden ser cada vez más susceptibles a la inactivación por parte del sistema inmunitario del huésped. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden mitigar la disminución mediada por T-reg de los linfocitos T reactivos a tumores al suprimir el crecimiento y la proliferación de los linfocitos T-reg que típicamente acompañan a la infusión de linfocitos T. Por ejemplo, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención pueden ser capaces de reducir el crecimiento de una población de linfocitos T-reg en aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 200 % con respecto a las células no tratadas (por ejemplo, un 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 % o 200 %). La reducción del crecimiento celular se produce incluso en presencia de TNF α . En algunos modos de realización, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención pueden ser capaces de restringir el crecimiento de una población de linfocitos T-reg en presencia de TNF α en entre un 90 % y un 150 % con respecto a las células no tratadas (por ejemplo, un 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 % o 150 %, como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 4). Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención también pueden restringir la proliferación de una población de linfocitos T-reg a menos de un 70 % (por ejemplo, un 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 %) de la de una población no tratada de linfocitos T-reg. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención también pueden disminuir la supervivencia de una población de linfocitos T-reg en aproximadamente un 10 % (por ejemplo, en aproximadamente un 20 %, 30 %, 40 %, o 50 % o más) con respecto a una población no tratada de linfocitos T-reg.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden administrar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece cáncer para mejorar la afección del paciente promoviendo la respuesta inmunitaria contra células cancerosas y material tumorogénico. Los anticuerpos de la invención se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, por medio de cualquiera de las vías de administración descritas en el presente documento. Los polipéptidos de la invención también se pueden formular con excipientes, vehículos biológicamente aceptables y opcionalmente se pueden conjugar, mezclar o coadministrar por separado (por ejemplo, secuencialmente) con agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes antineoplásicos. Los cánceres que se pueden tratar mediante la administración de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención incluyen cánceres tales como leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer cardíaco, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad bucal, cáncer ocular, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer testicular y cáncer de garganta. Los cánceres particulares que se pueden tratar mediante la administración de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen, sin limitación, leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (MLC), carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con SIDA, linfoma primario del SNC, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoideo/rabdoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer extrahepático, familia del sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, tumores embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso,

craneofaringioma, ependimoma, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma primario, cordoma, neoplasias mieloproliferativas crónicas, cáncer de colon, cáncer de vías biliares extrahepático, carcinoma ductal in situ (CDIS), cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de trompas de Falopio, histiocitoma fibroso de hueso, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales testiculares, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, glioma de tronco encefálico infantil, leucemia de células pilosas, cáncer hepatocelular, histiocitosis de células de Langerhans, linfoma hodgkiniano, cáncer de hipofaringe, tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos de páncreas, tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles, histiocitosis de células de Langerhans, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma cutáneo de linfocitos T, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso de cuello metastásico, carcinoma de línea media, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, cáncer de cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), cáncer de ovario epitelial, cáncer de ovario de células germinales, cáncer de ovario de bajo potencial maligno, tumores neuroendocrinos de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de senos paranasales y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer peritoneal primario, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de Kaposi, rhabdomyosarcoma, síndrome de Sézary, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y del uréter, cáncer uretral, cáncer de endometrio uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva y macroglobulinemia de Waldenström.

Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención, tales como variantes de TNFRAB1 y TNFRAB2 que tienen una región constante no natural, por ejemplo, anticuerpos TNFRAB1 y TNFRAB2 humanizados y fragmentos de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab), se pueden administrar a un paciente (por ejemplo, un paciente mamífero, tal como un paciente humano) para tratar el linfoma hodgkiniano o cutáneo no hodgkiniano, linfoma de linfocitos T, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma múltiple o carcinoma de células renales.

Un polipéptido anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo) de la invención también se puede coadministrar con un anticuerpo terapéutico que presente reactividad hacia una célula cancerosa. De esta manera, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención pueden actuar sinérgicamente no solo con la respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, prolongando la reactividad tumoral de los linfocitos T, sino también con otros inhibidores del crecimiento de células tumorales. Ejemplos de anticuerpos terapéuticos adicionales que se pueden usar para tratar el cáncer y otros trastornos de proliferación celular incluyen aquellos que presentan reactividad con un antígeno tumoral o una proteína de superficie celular que se sobreexpresa en la superficie de una célula cancerosa. Los anticuerpos ejemplares que se pueden mezclar, coadministrar o administrar secuencialmente con polipéptidos antagonistas del TNFR2 de la invención incluyen, sin limitación, Trastuzumab (HERCEPTIN®), Bevacizumab (AVASTIN®), Cetuximab (ERBITUX®), Panitumumab (VECTIBIX®), Ipilimumab (YERVOY®), Rituximab (RITUXAN® y MABTHERA®), Alemtuzumab (CAMPATH®), Ofatumumab (ARZERRA®), Gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), Brentuximab vedotin (ADCETRIS®), ⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan (ZEVALIN®) y ¹³¹I-Tositumomab (BEXXAR®), que se describen en detalle en Scott et al. (Cancer Immun., 12:14-21, 2012).

Un médico experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un polipéptido antagonista del TNFR2 para su administración a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite. Por ejemplo, un médico puede empezar prescribiendo dosis de un polipéptido de la invención a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. De forma alternativa, un médico puede comenzar un régimen de tratamiento administrando un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista del TNFR2 a una dosis alta y posteriormente administrar dosis progresivamente menores hasta lograr un efecto terapéutico (por ejemplo, una reducción del volumen de uno o más tumores, una disminución de la población de linfocitos T-reg, o remisión de un trastorno de proliferación celular). En general, una dosis diaria adecuada de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención será una cantidad del anticuerpo que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Un polipéptido monocatenario, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede administrar mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, opcionalmente proximal al sitio del tejido diana (por ejemplo, un tumor). Una dosis diaria de una composición terapéutica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede administrar como una dosis única o como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, semana, mes o año, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. Si bien es posible que un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se administre solo, también se puede administrar como una formulación farmacéutica en combinación con excipientes, vehículos y, opcionalmente, agentes terapéuticos adicionales.

Se puede monitorizar la capacidad de los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención para atenuar la progresión de una enfermedad de proliferación celular,

tal como cáncer, mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un médico puede monitorizar la respuesta de un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) al tratamiento con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o polipéptido monocatenario de la invención analizando el volumen de uno o más tumores en el paciente. Por ejemplo, los polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención pueden ser capaces de reducir el volumen del tumor entre un 1 % y un 100 % (por ejemplo, un 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 %). De forma alternativa, un médico puede monitorizar la capacidad de respuesta de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) al tratamiento con polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos antagonistas del TNFR2 de la invención analizando la población de linfocitos T-reg en el sistema linfático de un sujeto en particular. Por ejemplo, un médico puede extraer una muestra de sangre de un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) y determinar la cantidad o densidad de una población de linfocitos T-reg (por ejemplo, linfocitos T-reg CD4+ CD25+ FOXP3+ o linfocitos T-reg CD17+) usando procedimientos establecidos, tales como separación celular activada por fluorescencia.

Procedimientos de tratamiento de enfermedades infecciosas

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención también se pueden usar para tratar enfermedades infecciosas, tales como las causadas por uno cualquiera o más de un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. Por ejemplo, se pueden administrar polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece una enfermedad infecciosa para tratar la enfermedad, así como para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad.

Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se pueden usar para tratar o aliviar uno o más síntomas de infecciones víricas en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, causadas, por ejemplo, por un miembro de la familia *Flaviridae* (por ejemplo, un miembro de los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*), que incluye el virus de la hepatitis C, el virus de la fiebre amarilla; virus transmitidos por garrapatas, tales como virus *Gadgets Gully*, virus *Kadam*, virus de la enfermedad de la selva de *Kyasanur*, virus *Langat*, virus de la fiebre hemorrágica de *Omsk*, virus *Powassan*, virus *Royal Farm*, virus *Karshi*, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus *Neudoerfl*, virus *Sofjin*, virus encefalomiелitis ovina y el virus *Negishi*; virus transmitidos por garrapatas de aves marinas, tales como el virus *Meaban*, virus *Saumarez Reef* y el virus *Tyuleny*; virus transmitidos por mosquitos, como el virus *Aroa*, virus del dengue, virus *Kedougou*, virus *Cacipacore*, virus *Koutango*, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis del Valle de Murray, virus de la encefalitis de San Luis, virus *Usutu*, virus del Nilo Occidental, virus de Yaundé, virus *Kokobera*, virus *Bagaza*, virus *Ilhéus*, virus de la meningoencefalomiелitis del pavo de Israel, virus *Ntaya*, virus *Tembusu*, virus *Zika*, virus *Banzi*, virus *Bouboui*, virus *Edge Hill*, virus *Jugra*, virus *Saboya*, virus *Sepik*, virus *Uganda S*, virus *Wesselsbron*, virus de la fiebre amarilla; y virus sin vector artrópodo conocido, tales como el virus del murciélago de *Entebbe*, virus *Yokose*, virus *Apoi*, virus *Cowbone Ridge*, virus *Jutiapa*, virus *Modoc*, virus *Sal Vieja*, virus *San Perlita*, virus del murciélago de *Bukalasa*, virus de *Carey Island*, virus del murciélago de *Dakar*, virus de la leucoencefalitis myotidis de *Montana*, virus del murciélago de *Phnom Penh*, virus de *Rio Bravo*, virus del murciélago de *Tamana* y el virus del agente de fusión celular; un miembro de la familia *Arenaviridae*, que incluye el virus *Ippy*, virus *Lassa* (por ejemplo, la cepa *Josiah*, LP o *GA391*), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus *Mobala*, virus *Mopeia*, virus *Amapari*, virus *Flexal*, virus *Guanarito*, virus *Junín*, virus *Latino*, virus *Machupo*, virus *Oliveros*, virus *Paraná*, virus *Pichinde*, virus *Piritai*, virus *Sabiá*, virus *Tacaribe*, virus *Tamiami*, virus *Whitewater Arroyo*, virus *Chapare* y virus *Lujo*; un miembro de la familia *Bunyaviridae* (por ejemplo, un miembro de los géneros *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* y *Flebovirus*), que incluye el virus *Hantaan*, virus *Sin Nombre*, virus *Dugbe*, virus *Bunyamwera*, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de *La Crosse*, virus de la encefalitis de *California* y virus de la fiebre hemorrágica de *Crimea-Congo* (FHCC); un miembro de la familia *Filoviridae*, que incluye el virus del Ébola (por ejemplo, las cepas de *Zaire*, *Sudán*, *Costa de Marfil*, *Reston* y *Uganda*) y el virus de *Marburg* (por ejemplo, las cepas de *Angola*, *Ci67*, *Musoke*, *Popp*, *Ravn* y *Lago Victoria*); un miembro de la familia *Togaviridae* (por ejemplo, un miembro del género *Alphavirus*), que incluye el virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina occidental (EEO), virus *Sindbis*, virus de la rubéola, virus del bosque de *Semliki*, virus del río *Ross*, el virus del bosque de *Barmah*, virus *O'nyong'nyong* y el virus *chikungunya*; un miembro de la familia *Poxviridae* (por ejemplo, un miembro del género *Orthopoxvirus*), que incluye el virus de la viruela, virus de la viruela del simio y el virus *vaccinia*; un miembro de la familia *Herpesviridae*, que incluye el virus del herpes simple (HSV; tipos 1, 2 y 6), virus del herpes humano (por ejemplo, tipos 7 y 8), citomegalovirus (CMV), virus de *Epstein-Barr* (VEB), virus de la varicela-zóster y virus del herpes asociado al sarcoma de *Kaposi* (KSHV); un miembro de la familia *Ortomixoviridae*, que incluye el virus de la gripe (A, B y C), como el virus de la gripe aviar H5N1 o la gripe porcina H1N1; un miembro de la familia *Coronaviridae*, que incluye el virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS); un miembro de la familia *Rabdo*viridae, que incluye el virus de la rabia y el virus de la estomatitis vesicular (VSV); un miembro de la familia *Paramixoviridae*, que incluye el virus respiratorio sincitial humano (RSV), virus de la enfermedad de *Newcastle*, *hendravirus*, *nipahvirus*, virus del sarampión, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus *Sendai*, virus *paragripal* humano (por ejemplo, 1, 2, 3 y 4), *rinovirus* y virus de las *paperas*; un miembro de la familia *Picornaviridae*, que incluye el poliovirus, enterovirus humano (A, B, C y D), virus de la hepatitis A y el virus *coxsackie*; un miembro de la familia *Hepadnaviridae*, que incluye el virus de la hepatitis B; un miembro de la familia

Papillamoviridae, que incluye el virus del papiloma humano; un miembro de la familia *Parvoviridae*, que incluye virus adenoasociados; un miembro de la familia *Astroviridae*, que incluye el astrovirus; un miembro de la familia *Poliomaviridae*, que incluye el virus JC, virus BK y virus SV40; un miembro de la familia *Calciviridae*, que incluye el virus Norwalk; un miembro de la familia *Reoviridae*, que incluye el rotavirus; y un miembro de la familia *Retroviridae*, que incluye el virus de inmunodeficiencia humana (VIH; por ejemplo, tipos 1 y 2) y virus linfotrópico T humano tipos I y II (HTLV-1 y HTLV-2, respectivamente); virus de la leucemia de Friend; y encefalopatía espongiiforme transmisible, tal como la enfermedad consuntiva crónica. En particular, los procedimientos de la divulgación incluyen administrar un anticuerpo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1 y/o TNFRAB2) a un humano para tratar una infección por VIH (tal como un humano que padece SIDA).

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención también se pueden usar para tratar o aliviar uno o más síntomas de infecciones bacterianas en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano). Ejemplos de infecciones bacterianas que se pueden tratar mediante la administración de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención incluyen, sin limitación, las causadas por bacterias dentro de los géneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Neisseria*, *Actinobacter*, *Moraxella*, *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, *E. coli*, tal como O157:H7), *Pseudomonas* (tal como *Pseudomonas aeruginosa*), *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Haemophilus*, *Bordetella* (tal como *Bordetella pertussis*), *Legionella*, *Pasturella*, *Francisella*, *Brucella*, *Bartonella*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* (tal como *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium paratuberculosis* y *Helicobacter* (tal como *Helicobacter pylori* y *Helicobacter hepaticus*). En particular, los procedimientos de la divulgación incluyen administrar un anticuerpo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1 y/o TNFRAB2) a un ser humano o un mamífero no humano para tratar una infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Los procedimientos particulares de la divulgación incluyen administrar un anticuerpo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1 y/o TNFRAB2) a mamíferos bovinos o bisontes para tratar una infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Además, los procedimientos de la divulgación incluyen administrar un anticuerpo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1 y/o TNFRAB2) a un ser humano o un mamífero no humano para tratar una infección por *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Los procedimientos particulares de la divulgación incluyen administrar un anticuerpo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1 y/o TNFRAB2) a mamíferos bovinos o bisontes para tratar una infección por *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) de la invención también se pueden usar en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) para tratar o aliviar uno o más síntomas de infecciones parasitarias provocadas por un parásito protozoario (por ejemplo, un protozoo intestinal, un protozoo tisular o un protozoo sanguíneo) o un parásito helmíntico (por ejemplo, un nematodo, un helminto, un adenofóreo, un secernénteo, un trematodo, una duela (duelas sanguíneas, duelas hepáticas, duelas intestinales y duelas pulmonares) o un cestodo). Los parásitos protozoarios ejemplares que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium muris*, *Trypanosomatida gambiense*, *Trypanosomatida rhodesiense*, *Trypanosomatida cruzi*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelli*, *Trichomonas vaginalis* e *Histomonas meleagridis*. Los parásitos helmínticos ejemplares incluyen *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Wuchereria bancrofti*, and *Dracunculus medinensis*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Heterophyes*, *Paragonimus westermani*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana* y *Echinococcus granulosus*. Las

infecciones parasitarias adicionales que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen *Onchocercas volvulus*.

También se pueden usar polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) en un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) para tratar o aliviar uno o más síntomas de infecciones fúngicas. Los ejemplos de infecciones fúngicas que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, las provocadas, por ejemplo, por *Aspergillus*, *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Pneumocystis* y *Absidia*. Las infecciones fúngicas ejemplares que se pueden tratar de acuerdo con los procedimientos de la invención también incluyen *Pneumocystis carinii*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones terapéuticas que contienen un polipéptido antagonista del TNFR2, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la invención se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden preparar usando, por ejemplo, vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980)) y, en una forma deseada, por ejemplo, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las composiciones también se pueden preparar para contener el agente activo (por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-TNFR2 o fragmento del mismo) a una concentración deseada. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede contener al menos un 10 % (por ejemplo, un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o 100 %) de agente activo en peso (p/p).

Adicionalmente, un agente activo (por ejemplo, un anticuerpo antagonista del TNFR2 o fragmento del mismo de la invención) que se puede incorporar en una formulación farmacéutica puede tener en sí mismo un nivel de pureza deseado. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se puede caracterizar por un determinado grado de pureza después de aislar el anticuerpo de medios de cultivo celular o después de la síntesis química, por ejemplo, de un fragmento de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv) mediante procedimientos establecidos de síntesis de péptidos en fase sólida o unión química natural como se describe en el presente documento. Un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención puede tener al menos un 10 % de pureza antes de incorporar el anticuerpo en una composición farmacéutica (por ejemplo, un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % puro).

Las composiciones farmacéuticas de polipéptidos anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se pueden preparar para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables empleados típicamente en la técnica, por ejemplo, agentes tamponantes, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos diversos. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16.^a edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

Agentes tamponantes

Los agentes tamponantes ayudan a mantener el pH en un intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden estar presentes en concentraciones que varían de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos tales como tampones citrato (por ejemplo, mezcla citrato monosódico-citrato disódico, mezcla ácido cítrico-citrato trisódico, mezcla ácido cítrico-citrato monosódico, etc.), tampones succinato (por ejemplo, mezcla ácido succínico-succinato monosódico, mezcla ácido succínico-hidróxido de sodio, mezcla ácido succínico-succinato disódico, etc.), tampones tartrato (por ejemplo, mezcla ácido tartárico-tartrato de sodio, mezcla ácido tartárico-tartrato de potasio, mezcla ácido tartárico-hidróxido de sodio, etc.), tampones fumarato (por ejemplo, mezcla ácido fumárico-fumarato monosódico, mezcla ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones gluconato (por ejemplo, mezcla ácido glucónico-gluconato de sodio, mezcla ácido glucónico-hidróxido de sodio, mezcla ácido glucónico-gluconato de potasio, etc.), tampones oxalato (por ejemplo, mezcla ácido oxálico-oxalato de sodio, mezcla ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones lactato (por ejemplo, mezcla ácido láctico-lactato de sodio, mezcla ácido láctico-hidróxido de sodio, mezcla ácido láctico-lactato de potasio, etc.) y tampones acetato (por ejemplo, mezcla ácido acético-acetato de sodio, mezcla ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, se pueden usar tampones fosfato, tampones histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

Conservantes

Se pueden añadir conservantes a una composición de la invención para retardar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que varían entre 0,2 % y 1 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden añadir isotonicificadores en ocasiones conocidos como "estabilizadores" para garantizar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la invención e incluyen alditoles polihídricos, por ejemplo alditoles trihídricos o superiores, tales como glicerina, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes cuya función puede variar desde un agente voluminizador hasta un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a evitar la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizadores típicos pueden ser alditoles polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares o alditoles orgánicos, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitales tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 residuos o menos); proteínas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 partes en peso de proteína activa.

Detergentes

Se pueden añadir tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por la agitación, lo que también permite que la formulación se pueda exponer a tensiones superficiales de cizallamiento sin provocar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

Excipientes diversos adicionales incluyen agentes voluminizadores (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y codisolventes.

Otros vehículos farmacéuticos

Vehículos farmacéuticamente aceptables alternativos que se pueden incorporar en una composición de la invención pueden incluir, pero sin limitarse a, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de potasio, arginato, gelatina, silicato de potasio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabes, metilcelulosa, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Una composición que contiene un polipéptido antagonista del TNFR2 de la invención puede incluir además un lubricante, un humectante, un edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión y un conservante. Los detalles de vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences (19.^a ed., 1995).

Composiciones para politerapia

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir opcionalmente más de un agente activo. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden contener un polipéptido antagonista del TNFR2, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo conjugado con, mezclado con o administrado por separado de otra molécula farmacéuticamente activa, por ejemplo, un agente citotóxico, un antibiótico o un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T editado genéticamente para su uso en tratamiento con CAR-T). Por ejemplo, un polipéptido monocatenario, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado terapéutico del mismo antagonista del TNFR2 (por ejemplo, un conjugado fármaco-anticuerpo descrito en el presente documento), se puede mezclar con uno o más agentes activos adicionales que se pueden usar para tratar el cáncer u otro trastorno de proliferación celular (por ejemplo, neoplasia). De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para coadministración o administración secuencial con uno o más agentes activos adicionales que se pueden usar para tratar el cáncer u otros trastornos de proliferación celular. Ejemplos de agentes activos adicionales que se pueden usar para tratar el cáncer y otros trastornos de proliferación celular y que se pueden conjugar con, mezclar con o administrar por separado de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención incluyen agentes citotóxicos. (por ejemplo, los descritos en el presente documento), así como anticuerpos que presentan reactividad con un antígeno tumoral o una proteína

de superficie celular que se sobreexpresa en la superficie de una célula cancerosa. Los anticuerpos ejemplares que se pueden conjugar con, mezclar con o administrar por separado de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención incluyen, sin limitación, Trastuzamb (HERCEPTIN®), Bevacizumab (AVASTIN®), Cetuximab (ERBITUX®), Panitumumab (VECTIBIX®), Ipilimumab (YERVOY®), Rituximab (RITUXAN® y MABTHERA®), Alemtuzumab (CAMPATH®), Ofatumumab (ARZERRA®), Gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®), Brentuximab vedotin (ADCETRIS®), ⁹⁰Y-Ibritumomab Tiuxetan (ZEVALIN®), and ¹³¹I-Tositumomab (BEXXAR®), que se describen en detalle en Scott et al. (Cancer Immun., 12:14-21, 2012).

Agentes adicionales que se pueden conjugar con, mezclar con o administrar por separado de polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención incluyen linfocitos T que presentan reactividad con un antígeno específico asociado con una patología particular. Por ejemplo, los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se pueden formular para administración con un linfocito T que expresa un receptor de antígeno quimérico (CAR-T) para tratar un trastorno de proliferación celular, tal como un cáncer descrito en el presente documento. Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) pueden actuar sinérgicamente con el tratamiento con CAR-T evitando que los linfocitos T-reg desactiven los linfocitos T que se han modificado genéticamente para expresar receptores de antígenos reactivos a tumores. De esta manera, los linfocitos CAR-T se pueden administrar a un paciente antes de, simultáneamente con o después de la administración de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo antagonista del TNFR2 para tratar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que padece un trastorno de proliferación celular, tal como cáncer.

El tratamiento con CAR-T es una plataforma en particular sólida para dirigirse a células cancerosas en vista de la capacidad de genomanipular los linfocitos T para expresar un receptor de antígeno específico de un antígeno asociado a tumor. Por ejemplo, la identificación de antígenos sobreexpresados en las superficies de tumores y otras células cancerosas puede contribuir al diseño y descubrimiento de receptores de linfocitos T quiméricos, que a menudo se componen de dominios citoplasmáticos y transmembrana derivados de un receptor de linfocitos T natural enlazado de forma funcional a un fragmento scFv extracelular que se une específicamente a un péptido antigénico particular. Los linfocitos T se pueden modificarse genéticamente para expresar un receptor de antígeno que se une específicamente a un antígeno tumoral particular mediante cualquiera de una variedad de técnicas de edición del genoma descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Las técnicas ejemplares para modificar el genoma de linfocitos T para incorporar un gen que codifica un receptor de antígeno quimérico incluyen las plataformas CRISPER/Cas, nucleasa de dedos de zinc, TALEN, ARCUS™ descritas en el presente documento. Se han descrito procedimientos para la genomanipulación de linfocitos CAR-T, por ejemplo, en los documentos WO 2014/127261, WO 2014/039523, WO 2014/099671 y WO 20120790000.

Los linfocitos CAR-T útiles en las composiciones y procedimientos de la invención incluyen aquellos que se han modificado genéticamente de modo que la célula no expresa el receptor endógeno de linfocitos T. Por ejemplo, un linfocito CAR-T se puede modificar mediante técnicas de edición del genoma, tales como las descritas en el presente documento, para suprimir la expresión del receptor endógeno de linfocitos T para evitar reacciones de injerto contra huésped en un paciente que está recibiendo una infusión de CAR-T. Adicionalmente o de forma alternativa, los linfocitos CAR-T se pueden modificar genéticamente para reducir la expresión de una o más proteínas MHC endógenas. Esta es una técnica en particular útil para la infusión de linfocitos T alogénicos, ya que el reconocimiento de proteínas MHC exógenas representa un mecanismo que promueve el rechazo del aloinjerto. Un experto en la técnica también puede modificar un linfocito T para suprimir la expresión de proteínas inmunosupresoras, tales como la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) y la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Estas proteínas son receptores de superficie celular que, cuando se activan, atenúan la activación de los linfocitos T. La infusión de linfocitos CAR-T que se han modificado genéticamente para disminuir la expresión de una o más proteínas inmunosupresoras representa una estrategia que se puede usar para prolongar la citotoxicidad mediada por linfocitos T *in vivo*.

Además de eliminar genes específicos, también se pueden modificar linfocitos CAR-T para expresar un receptor de linfocitos T con una especificidad antigénica deseada. Por ejemplo, se puede modificar genéticamente un linfocito T para expresar un receptor de linfocitos T que se una específicamente a un antígeno asociado a tumor para dirigir los linfocitos T infundidos hacia las células cancerosas. Un receptor de linfocitos T ejemplar que se puede expresar mediante un linfocito CAR-T es uno que se une a PD-L1, una proteína de superficie celular que a menudo se sobreexpresa en diversas células tumorales. Dado que PD-L1 activa PD-1 en la superficie de los linfocitos T, dirigirse a este antígeno tumoral mediante tratamiento con CAR-T puede crear sinergia con los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención para incrementar la duración de una respuesta inmunitaria mediada por un linfocito T *in vivo*. Los linfocitos CAR-T también se pueden modificar para expresar un receptor de linfocitos T que se una específicamente a un antígeno asociado con una o más enfermedades infecciosas, tal como un antígeno derivado de una proteína vírica, una célula bacteriana, un hongo u otro organismo parásito.

Otras composiciones farmacéuticas de la invención incluyen aquellas que contienen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista del TNFR2, interferón alfa y/o uno o más antibióticos que se pueden administrar a un

paciente (por ejemplo, un paciente humano) que padece una enfermedad infecciosa. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antagonista del TNFR2 se puede conjugar con, mezclar con o administrar por separado de un antibiótico útil para tratar una o más enfermedades infecciosas, tales como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina, paromomicina, estreptomycin, espectinomicina, geldanamycin, herbimicina, rifaximina, loracarbef, ertapenem, doripenem, imipenem, meropenem, cefadroxilo, cefazolina, cefazlexina, cefaclor, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, clindamicina, lincomicina, daptomicina, eritromicina, linezolid, torezolid, amoxicilina, ampicilina, bacitracina, ciprofloxacina, doxiciclina y tetraciclina, entre otros.

Penetración de la barrera hematoencefálica

En determinados modos de realización, se pueden formular polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que las composiciones terapéuticas de la invención atraviesen la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Se han descrito procedimientos de fabricación de liposomas, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, potenciando de este modo la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (J. Clin. Pharmacol. 29:685, 1989)). Los restos de dirección ejemplares incluyen, por ejemplo, folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.416.016); manósidos (Umezawa et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038, 1988)); anticuerpos (P. G. Bloeman et al. (FEBS Lett. 357:140, 1995); M. Owais et al. (Antimicrob. Agents Chemother. 39:180, 1995)); receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al. (Am. J. Physiol. 1233:134, 1995)).

Vías de administración y dosificación

Los polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención se pueden administrar a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) mediante una variedad de vías tales como oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intraocular, intratumoral, parenteral, tópica, intratecal e intracerebroventricular. La vía de administración más adecuada en un caso determinado dependerá del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno particular administrado, del paciente, de los procedimientos de formulación farmacéutica, de los procedimientos de administración (por ejemplo, del tiempo de administración y de la vía de administración), de la edad, el peso corporal y el sexo del paciente, de la gravedad de las enfermedades que se tratan, de la dieta del paciente y de la tasa de excreción del paciente.

La dosis eficaz de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo anti-TNFR2 de la invención puede variar de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por administración única (por ejemplo, bolo), administraciones múltiples o administración continua, o para lograr una concentración sérica de 0,0001-5000 µg/ml de concentración sérica por administración única (por ejemplo, bolo), administraciones múltiples o administración continua, o cualquier intervalo o valor eficaz en el mismo dependiendo de la afección que se esté tratando, de la vía de administración y de la edad, peso y condición del sujeto. En determinados modos de realización, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, cada dosis puede variar de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, se puede administrar una composición farmacéutica de la invención en una dosis diaria en el intervalo de 0,001 a 100 mg/kg (peso corporal). Se puede administrar la dosis una o más veces (por ejemplo, 2-10 veces) por día, semana, mes o año a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano) que lo necesite.

Se pueden administrar las composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un modo de realización, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en la patente de EE. UU. n.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la invención incluyen: la patente de EE. UU. n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; la patente de EE. UU. n.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE. UU. n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión exacta; la patente de EE. UU. n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente de EE. UU. n.º 4.439.196, que divulga un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos multicámara; y la patente de EE. UU. n.º 4.475.196, que divulga un sistema osmótico de administración de fármacos. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración y módulos.

Kits que contienen polipéptidos antagonistas anti-TNFR2

La presente invención también incluye kits que contienen polipéptidos antagonistas anti-TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos). Los kits proporcionados en el presente documento pueden contener cualquiera de los polipéptidos antagonistas del TNFR2 descritos anteriormente, así

como cualquiera de los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, vectores que contienen estos polipéptidos o células genomanipuladas para expresar y secretar polipéptidos de la invención (por ejemplo, células procariotas o eucariotas). Un kit de esta invención puede incluir reactivos que se pueden usar para producir las composiciones de la invención (por ejemplo, polipéptidos antagonistas anti-TNFR2, tales como polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos, conjugados que contienen polipéptidos antagonistas anti-TNFR2, polinucleótidos que codifican polipéptidos antagonistas anti-TNFR2, vectores que contienen estos polipéptidos). Opcionalmente, los kits de la invención pueden incluir reactivos que pueden inducir la expresión de anticuerpos antagonistas del TNFR2 dentro de las células (por ejemplo, células de mamífero), tales como doxiciclina o tetraciclina. En otros casos, un kit de la invención puede contener un compuesto que se puede unir y puede detectar una proteína de fusión que contiene un polipéptido antagonista del TNFR2 y una marca de epítipo. Por ejemplo, en dichos casos, un kit de la invención puede contener maltosa, glutatión, un complejo que contiene níquel, un anticuerpo anti-FLAG, un anticuerpo anti-myc, un anticuerpo anti-HA, biotina o estreptavidina.

Los kits de la invención también pueden incluir reactivos que pueden detectar directamente un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista del TNFR2. Ejemplos de dichos reactivos incluyen anticuerpos secundarios que reconocen y se unen selectivamente a rasgos característicos estructurales particulares dentro de la región Fc de un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención. Los kits de la invención pueden contener anticuerpos secundarios que reconocen la región Fc de un anticuerpo antagonista del TNFR2 y que están conjugados con una molécula fluorescente. Estos conjugados anticuerpo-fluoróforo proporcionan una herramienta para analizar la localización de anticuerpos antagonistas anti-TNFR2, por ejemplo, en un tejido o célula de mamífero cultivada particular usando técnicas de inmunofluorescencia establecidas. En algunos modos de realización, los kits de la invención pueden incluir compuestos fluorescentes adicionales que presentan patrones de localización subcelular conocidos. Estos reactivos se pueden usar en combinación con otro conjugado anticuerpo-fluoróforo, por ejemplo, uno que reconozca específicamente un receptor diferente en la superficie celular para analizar la localización de un anticuerpo anti-TNFR2 con respecto a otras proteínas de superficie celular.

Los kits de la invención también pueden contener un reactivo que se puede usar para el análisis de la respuesta de un paciente al tratamiento mediante la administración de polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención. Por ejemplo, los kits de la invención pueden incluir un polipéptido antagonista del TNFR2, tal como un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y uno o más reactivos que se pueden usar para determinar la cantidad de linfocitos T-reg en una muestra de sangre extraída de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que está en tratamiento con un anticuerpo de la invención. Dicho kit puede contener, por ejemplo, anticuerpos que se unen selectivamente a antígenos de superficie celular presentados por linfocitos T-reg, tales como CD4 y CD25. Opcionalmente, estos anticuerpos se pueden marcar con un tinte fluorescente, tal como fluoresceína o tetrametilrodamina, para facilitar el análisis de una población de linfocitos T-reg mediante procedimientos de separación celular activada por fluorescencia (FACS) conocidos en la técnica. Los kits de la invención pueden contener opcionalmente uno o más reactivos que se pueden usar para cuantificar una población de linfocitos T reactivos a tumores para determinar la eficacia de un polipéptido antagonista del TNFR2 de la invención en el restablecimiento de la proliferación de linfocitos infiltrantes de tumores. Por ejemplo, los kits de la invención pueden contener un anticuerpo que se une selectivamente a marcadores de superficie celular en la superficie de un linfocito T citotóxico, tal como CD8 o CD3. Opcionalmente, estos anticuerpos se pueden marcar con moléculas fluorescentes para permitir la cuantificación mediante análisis FACS.

Un kit de la invención también puede contener uno o más reactivos útiles para determinar la afinidad y selectividad de un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo antagonista del TNFR2 de la invención por uno o más péptidos derivados de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117, o un péptido que contiene entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 aminoácidos continuos o discontinuos entre las posiciones 80 y 130 de SEQ ID NO: 7). Por ejemplo, un kit puede contener un anticuerpo antagonista del TNFR2 y uno o más reactivos que se pueden usar en un ensayo ELISA para determinar la K_D de un anticuerpo de la invención para uno o más péptidos que presentan un epítipo de TNFR2 en una conformación similar a la del epítipo en la proteína natural. Un kit puede contener, por ejemplo, una placa de microvaloración que contiene pocillos que se han conjugado previamente con avidina, y puede contener una colección de péptidos derivados de TNFR2, cada uno de los cuales está conjugado con un resto de biotina. Dicho kit puede contener opcionalmente un anticuerpo secundario que se une específicamente a la región Fc de un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención, y el anticuerpo secundario se puede conjugar con una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante) que cataliza una reacción química que da como resultado la emisión de luz luminiscente.

Los kits de la invención también pueden contener polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) de la invención y reactivos que se pueden conjugar con dicho polipéptido, incluyendo los descritos previamente (por ejemplo, un agente citotóxico, una molécula fluorescente, una molécula bioluminiscente, una molécula que contiene un isótopo radiactivo, una molécula que contiene un grupo quelante unido a un ion paramagnético, etc.). Estos kits pueden contener adicionalmente

instrucciones sobre cómo se puede lograr la conjugación de un polipéptido antagonista del TNFR2 de la invención con una segunda molécula, tal como las descritas anteriormente.

Un kit de la invención también puede contener un vector que contiene un polinucleótido que codifica un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista anti-TNFR2, tal como cualquiera de los vectores descritos en el presente documento. De forma alternativa, un kit puede incluir células de mamífero (por ejemplo, células CHO) que se han alterado genéticamente para expresar y secretar polipéptidos antagonistas del TNFR2 (por ejemplo, polipéptidos monocatenarios, anticuerpos o fragmentos de los mismos) a partir del genoma nuclear de la célula. Dicho kit también puede contener instrucciones que describen cómo se puede inducir la expresión del polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista anti-TNFR2 a partir de un polinucleótido, y puede incluir adicionalmente reactivos (tales como, por ejemplo, doxiciclina o tetraciclina) que se pueden usar para promover la transcripción de estos polinucleótidos. Dichos kits pueden ser útiles para la fabricación de anticuerpos antagonistas del TNFR2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención.

Otros kits de la invención pueden incluir herramientas para genomanipular una célula procariota o eucariota (por ejemplo, una célula CHO o una célula de *E. coli* BL21 (DE3)) para expresar y secretar un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista del TNFR2 de la invención a partir del genoma nuclear de la célula. Por ejemplo, un kit puede contener células CHO almacenadas en un medio apropiado y opcionalmente congeladas de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. El kit también puede proporcionar un vector que contiene un polinucleótido que codifica una nucleasa (por ejemplo, tales como las nucleasas de CRISPER/Cas, nucleasa con dedos de zinc, TALEN, ARCUS™ descritas en el presente documento), así como reactivos para expresar la nucleasa en la célula. El kit puede proporcionar adicionalmente herramientas para modificar el polinucleótido que codifica la nucleasa para permitir alterar la secuencia de ADN de la nucleasa para dirigir la escisión de una secuencia de ADN diana específica de interés. Ejemplos de dichas herramientas incluyen cebadores para la amplificación y mutagénesis dirigida del polinucleótido que codifica la nucleasa de interés. El kit también puede incluir enzimas de restricción que se pueden usar para escindir selectivamente el polinucleótido que codifica la nucleasa del vector y posteriormente reintroducir nuevamente el polinucleótido modificado en el vector una vez que el usuario ha modificado el gen. Dicho kit también puede incluir una ADN ligasa que se puede usar para catalizar la formación de enlaces fosfodiéster covalentes entre el polinucleótido que codifica la nucleasa modificado y el vector diana. Un kit de la invención también puede proporcionar un polinucleótido que codifica un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista anti-TNFR2, así como un prospecto que describe los procedimientos que se pueden usar para escindir selectivamente una secuencia de ADN particular en el genoma de la célula para incorporar el polinucleótido que codifica un polipéptido antagonista del TNFR2 en el genoma en este sitio. Opcionalmente, el kit puede proporcionar un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que contiene un polipéptido monocatenario, anticuerpo o fragmento del mismo antagonista del TNFR2 y un polipéptido adicional, tal como, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción de cómo se realizan, preparan y evalúan las composiciones y procedimientos reivindicados en el presente documento, y pretenden ser puramente ejemplares de la invención.

Ejemplo 1. Mapeo de los epítomos discretos dentro de TNFR2 que interactúan con TNFRAB1 y TNFRAB2

Se cribaron colecciones de péptidos lineales, cíclicos y bicíclicos derivados de TNFR2 humano para seleccionar secuencias específicas dentro de la proteína que presentan alta afinidad por el anticuerpo contra TNFR2 TNFRAB2. Para cribar epítomos conformacionales dentro de TNFR2, se conjugaron entre sí péptidos de regiones específicas de la secuencia de la proteína primaria para formar péptidos quiméricos. Estos péptidos contenían residuos de cisteína en posiciones estratégicas dentro de sus secuencias primarias (véase, por ejemplo, la figura 3, SEQ ID NO: 34-117 y 134-252). Esto facilitó una estrategia de reticulación intramolecular que se usó para limitar los péptidos individuales a una de una amplia gama de conformaciones tridimensionales. Los tioles desprotegidos de residuos de cisteína se reticularon mediante reacciones de sustitución nucleófila con electrófilos divalentes y trivalentes, tales como 2,6-bis(bromometil)piridina y 1,3,5-tris(bromometil)benceno, para formar péptidos cíclicos y bicíclicos conformacionalmente restringidos, respectivamente. De esta manera, se limitaron los péptidos que contienen combinaciones únicas de aminoácidos de regiones dispares de la secuencia primaria de TNFR2 para preorganizar estructuralmente los epítomos que se pueden asemejar a los presentados en la estructura terciaria de TNFR2 natural. Se seleccionaron las colecciones que contenían estos péptidos inmovilizando péptidos en regiones específicas de una superficie sólida y tratando la superficie a su vez con TNFRAB1 o TNFRAB2, anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y sustrato de HRP (sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina) en presencia de peróxido de hidrógeno. Se lavó la superficie sólida entre tratamientos con reactivos sucesivos para eliminar el exceso o los materiales no específicamente unidos. Posteriormente, se analizó la luminiscencia de cada región de cada superficie usando un dispositivo de carga acoplada (CCD) con cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

La plataforma "Constrained Libraries of Peptides on Surfaces" (CLIPS) comienza con la conversión de la proteína diana, por ejemplo, TNFR2, en una colección de hasta 10.000 construcciones peptídicas superpuestas, usando un diseño de matriz combinatoria (Timmerman et al., J. Mol. Recognit., 20: 283-29, 2007). Sobre un soporte sólido se sintetiza una matriz de péptidos lineales, a los que posteriormente se les da forma en construcciones CLIPS espacialmente definidas. Las construcciones que representan múltiples partes del epítipo discontinuo en la conformación correcta se unen al anticuerpo con alta afinidad, que se detecta y cuantifica. Las construcciones que presentan el epítipo incompleto se unen al anticuerpo con menor afinidad, mientras que las construcciones que no contienen el epítipo no se unen en absoluto. Se usa la información de afinidad en cribados iterativos para definir en detalle la secuencia y la conformación de los epítopos. Los datos de luminiscencia sin procesar obtenidos de estos experimentos ELISA se informan en las figuras 3A y 3B para TNFRAB1 y TNFRAB2, respectivamente. Estos resultados informaron del análisis de los epítopos presentes en la superficie de TNFR2 que se unen a anticuerpos antagonistas del TNFR2. En las figuras 4 y 15A-15C se muestran modelos estructurales de TNFR2 que ilustran epítopos que se unen a dichos anticuerpos.

Síntesis de péptidos

Se sintetizó una colección de péptidos para reconstruir los epítopos de la molécula diana. Se obtuvo un soporte de polipropileno funcionalizado con amino injertando una formulación de polímero hidrófilo patentada por medio de una reacción con t-butiloxicarbonil-hexametilendiamina (BocHMDA) usando diciclohexilcarbodiimida (DCC) con N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y posterior escisión de los grupos Boc usando ácido trifluoroacético (TFA). Se usó la síntesis estándar de Fmoc-péptidos para sintetizar péptidos sobre el soporte sólido funcionalizado con amino mediante estaciones de manipulación de líquidos JANUS® modificadas de forma personalizada (Perkin Elmer). La tecnología CLIPS permite estructurar los péptidos en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, pliegues de tipo lámina, pliegues de tipo hélice y combinaciones de los mismos. Los moldes CLIPS se acoplan a residuos de cisteína. Las cadenas laterales de múltiples cisteínas en los péptidos se acoplan a uno o dos moldes CLIPS. Por ejemplo, se disuelve una solución 0,5 mM del molde CLIPS (2,6-bis(bromometil)piridina) en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,8)/acetonitrilo (1:3 (v/v)). Se añade esta solución a una matriz de péptidos unidos a la superficie. El molde CLIPS reaccionará con las cadenas laterales de dos cisteínas presentes en los péptidos unidos a fase sólida de las matrices de péptidos (placa de 455 pocillos con pocillos de 3 µl). Se agitan suavemente las matrices de péptidos en la solución durante 30 a 60 minutos mientras están completamente cubiertas por la solución. Finalmente, se lavan extensamente las matrices de péptidos con un exceso de H₂O y se someten a ultrasonidos en un tampón disruptivo que contiene SDS al 1 % / beta-mercaptoetanol al 0,1 % en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 minutos, seguido de un baño de ultrasonidos en H₂O durante otros 45 minutos.

Análisis de las afinidades de unión de anticuerpos antagonistas del TNFR2 mediante resonancia de plasmón de superficie

Se midieron las afinidades de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 por TNFR2 humano recombinante usando servicios de análisis BIACORE™ (Precision Antibody). En resumen, se biotiniló el anticuerpo en una proporción estequiométrica 5:1 usando biotini-LC-LC-NOSE (Thermo-Fisher) en PBS. Se eliminó el exceso de reactivo de biotinilación mediante cromatografía de centrifugación y se capturó el anticuerpo biotinilado en 3000 UR de superficie de estreptavidina hasta un nivel de 100 UR. El máximo teórico de señal con TNFR2 con ese nivel de captura de anticuerpos fue de 26 UR y dicha señal se alcanzó con un experimento preliminar usando TNFR2 500 nM en el tampón de migración. Se realizó el análisis de la cinética de unión a antígeno a un flujo de 60 µl/min con inyecciones de 2 min. Se inyectaron anticuerpos a una concentración de 1 mg/ml hasta la captura final de 100 UR. El instrumento usado fue BIACORE™ 3000 con el chip BioCap (GE Healthcare). Se usó un procedimiento de doble referencia para el análisis. El canal de referencia contenía el mismo nivel de estreptavidina. Los parámetros termodinámicos y cinéticos de la unión de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 TNFRAB1 y TNFRAB2 a TNFR2 medidos usando este ensayo se muestran en la figura 13A.

Cribado mediante ELISA

Se analizó la unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados en formato ELISA. Se incubaron matrices de péptidos inmovilizados en superficie con una solución de anticuerpo primario (durante la noche a 4 °C). Después del lavado, se incubaron las matrices de péptidos con una dilución 1/1000 de un conjugado anticuerpo-peroxidasa (SBA) apropiado durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añadió el sustrato de peroxidasa sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 2 µl/ml de H₂O₂ al 3 por ciento. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. Se cuantificó el desarrollo de color con un dispositivo de carga acoplada (CCD) con una cámara y un sistema de procesamiento de imágenes. Los valores obtenidos de la cámara CCD varían de 0 a 3000 mAU, similares a los de un lector ELISA de placas de 96 pocillos estándar. Los resultados se cuantifican y almacenan en la base de datos Peplab. Ocasionalmente, un pocillo contiene una burbuja de aire que da como resultado un valor falso positivo, las tarjetas se inspeccionan manualmente y cualquier valor causado por una burbuja de aire se califica como 0.

Para verificar la calidad de los péptidos sintetizados, se sintetizó en paralelo un conjunto separado de péptidos de control positivo y negativo. Estos se cribaron con un control negativo, el anticuerpo 57.9, un anticuerpo que no se une específicamente a TNFR2 (Posthumus et al. (J. Virology. 64:3304-3309, 1990)).

- 5 Los péptidos que se unieron a TNFRAB1 y TNFRAB2 con alta afinidad se resaltan en las figuras 3A y 3B, respectivamente. Por lo tanto, estos péptidos contienen residuos dentro de TNFR2 que se configuran estructuralmente en epítopos que se unen preferentemente a TNFRAB1 y TNFRAB2.

Maapeo de epítopos

- 10 También se usó ELISA para determinar los epítopos lineales presentes en la superficie extracelular de TNFR2. Se adquirieron péptidos lineales correspondientes a diversas regiones dentro de la secuencia primaria de TNFR2 de GenScript (Piscataway, NJ), se diluyeron en tampón de recubrimiento y se colocaron en placas de microvaloración de fondo plano Immulon 4HBX (Thermo Scientific) a una concentración de 1 µg/pocillo. Se incubaron anticuerpos antagonistas del TNFR2 primarios (0,1 µg/pocillo) con sustratos. Se usaron anticuerpos secundarios contra IgG de roedor para detectar los anticuerpos primarios. Se midió la absorbancia usando el lector de absorbancia de placas SPECTRAMAX® 190 y se analizó con SoftMax Pro 6.3 (Molecular Devices). Los resultados de estos ensayos basados en ELISA se muestran en las figuras 13B y 13C.

20 Ejemplo 2. Anticuerpos antagonistas del TNFR2 que inhiben la proliferación de linfocitos T-reg

Materiales y procedimientos

- 25 • Kit Human T-reg Flow™ (BioLegend, n.º cat. 320401)
 - ◦ Cóctel anti-CD4 humano PE-Cy5/CD25 PE (BioLegend, ref. 78930)
 - ◦ Alexa Fluor® 488 anti-FOXP3 humano, clon 259D (BioLegend, ref. 79467)
 - 30 ◦ ◦ Alexa Fluor® 488 anti-IgG1 de ratón, control de isotipo k (ICFC), clon MOPC-21 (BioLegend, ref. 79486)
 - ◦ Tampón FOXP3 Fix/Perm (4X) (BioLegend, n.º cat. 421401)
 - ◦ Tampón FOXP3 Perm (10X) (BioLegend, n.º cat. 421402)
- 35 • PE anti-CD25 humano, clon: BC96 (BioLegend, n.º cat. 302606)
- Alexa Fluor® 488 anti-FOXP3 humano, clon 259D (BioLegend, n.º cat. 320212)
- 40 • PBS pH 7,4 (1X) (Gibco, n.º cat. 10010-023)
- HBSS (1X) (Gibco, n.º cat. 14175-095)
- FBS (inactivado por calor)
- 45 • Tubos de 15 ml
- Centrífuga de sobremesa con rotor basculante para tubos de 15 ml (velocidad ajustada a 1100 rpm o 200 x g)

- 50 Se analizó la capacidad de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 (TNFRAB1 y TNFRAB2) para suprimir la proliferación de linfocitos T-reg. Se trataron linfocitos T-reg cultivados con concentraciones variables de anticuerpos antagonistas del TNFR2 en presencia y ausencia de factores de crecimiento estimuladores (por ejemplo, TNFα) durante períodos de tiempo establecidos. También se cultivaron linfocitos T-reg en presencia de TNFRAB1 a diversas concentraciones que variaban entre 0,0008 y 25 µg/ml en presencia y ausencia de TNFα.
- 55 Como controles, también se incubaron linfocitos T-reg con TNFα solo a concentraciones que variaban entre 0 y 40 ng/ml para seleccionar niveles de TNFα que indujeran un alto incremento porcentual en el recuento de linfocitos T-reg. Adicionalmente, se cultivaron linfocitos T-reg en presencia de IL-2 sola y en presencia de TNFRAB2 solo.

- 60 Después de la incubación de los linfocitos T-reg en las condiciones descritas anteriormente, se determinaron los recuentos de células mediante análisis de citometría de flujo. Se distribuyeron linfocitos T-reg a una densidad de $0,2-1 \times 10^6$ células/100 µl en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugaron durante 5 minutos para sedimentar las células. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 µl de tampón de lavado (HBSS 1x que contenía FBS al 2 %). Se añadieron a esta mezcla 5 µl de conjugado anticuerpo-fluoróforo PE anti-CD25 humano y, posteriormente, las células se agitaron en vórtex y se incubaron en oscuridad durante 25 minutos. A

continuación, se lavaron las células añadiendo 1 ml de tampón de lavado y posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se añadió a las células 1 ml de tampón de fijación/permeabilización de FoxP3 (dilución 1:4 de tampón FOXP3 Fix/Perm 4x en PBS). A continuación, se agitaron las células en vórtex y se incubaron en oscuridad durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las células durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendieron las células en 1 ml de tampón de lavado recién preparado, se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron las células en 1 ml de tampón FOXP3 Perm 1x (dilución 1:10 de tampón FOXP3 Perm 10x en PBS), se agitaron en vórtex y se incubaron en oscuridad durante 15 minutos. Después de la incubación, se centrifugaron las células durante 5 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendió el sedimento celular en 100 µl de tampón FOXP3 Perm 1x. En este punto, se añadieron a las células 5 µl de Alexa Fluor® 488 anti-FOXP3 humano o Alexa Fluor® 488 anti-IgG1 de ratón, control de isotipo k. A continuación, se agitaron las células en vórtex y se incubaron en oscuridad durante 35 minutos. Después de la incubación, se lavaron las células añadiendo 1 ml de tampón de lavado recién preparado a las células, agitando las células en vórtex y centrifugando durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 0,2-0,5 ml de HBSS 1x sin FBS. A continuación, se determinaron los recuentos celulares mediante análisis de citometría de flujo.

Como se observa en la figura 5, la incubación del anticuerpo antagonista del TNFR2 TNFRAB1 suprimió la proliferación de linfocitos T-reg de una manera dependiente de la dosis incluso cuando las células se incubaron conjuntamente con 20 ng/ml de TNFα. Sorprendentemente, esta concentración de TNFα pudo inducir el mayor incremento porcentual en el recuento de linfocitos T-reg entre las dosis de TNFα analizadas en muestras de T-reg tratadas con TNFα solo. El hecho de que TNFRAB1 pueda disminuir la proliferación de linfocitos T-reg incluso en presencia de niveles activadores de TNFα indica que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden no solo competir con TNFα por la unión al receptor, sino que también presentan la capacidad de inhibir cascadas de señalización posteriores que dan lugar a crecimiento y proliferación de linfocitos T-reg. Por ejemplo, cuando se incubaron linfocitos T-reg con TNFα solo a 20 ng/ml, la población de T-reg resultante se incrementó hasta un 130 % de las células de control no tratadas. Sin embargo, tras la incubación conjunta de linfocitos T-reg a 20 ng/ml con TNFRAB1, se observa una supresión constante de la proliferación celular dependiente de la dosis a concentraciones que varían entre 0,004 y 1,25 µg/ml de TNFRAB1.

Ejemplo 3. Generación de anticuerpos antagonistas del TNFR2 mediante presentación en fagos

Un procedimiento ejemplar para la evolución de proteínas *in vitro* de anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención es la presentación en fagos, una técnica que es bien conocida en la técnica. Se pueden crear colecciones de presentación en fagos preparando una serie diseñada de mutaciones o variaciones dentro de una secuencia codificante para las CDR de un anticuerpo o las regiones análogas de un andamio similar a anticuerpo (por ejemplo, los bucles BC, CD y DE de dominios ¹⁰Fn3). La secuencia que codifica el anticuerpo molde en la que se introducen estas mutaciones puede ser, por ejemplo, una secuencia de línea germinal humana natural como se describe en el presente documento. Estas mutaciones se pueden realizar usando técnicas de mutagénesis estándar descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Por tanto, cada secuencia mutante codifica un anticuerpo que corresponde al molde en cuanto a su estructura general, excepto que tiene una o más variaciones de aminoácidos en la secuencia del molde. Se pueden genomanipular vectores retrovíricos y de presentación en fagos usando técnicas de construcción de vectores estándar como se describen en el presente documento o se conocen en la técnica. Se pueden usar vectores de presentación en fagos P3 junto con vectores de expresión de proteínas compatibles, como es bien conocido en la técnica, para generar vectores de presentación en fagos para diversificación de anticuerpos, como se describe en el presente documento.

El ADN mutado proporciona diversidad de secuencia, y cada fago transformante presenta una variante de la secuencia de aminoácidos molde inicial codificada por el ADN, lo que da lugar a una población (colección) de fagos que presenta una gran cantidad de secuencias de aminoácidos diferentes pero estructuralmente relacionadas. Debido a la estructura bien definida de las regiones hipervariables de los anticuerpos, se espera que las variaciones de aminoácidos introducidas en un cribado de presentación en fagos alteren las propiedades de unión del péptido o dominio de unión sin alterar significativamente su estructura.

En un cribado típico, una colección de fagos se pone en contacto con y se permite la unión a un péptido derivado de TNFR2 (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NO: 11, 19, 20 y 34-117 y, en particular, aquellos que contienen el motivo KCRPG, como en las SEQ ID NO: 42, 50, 52-54 y 61-63) o un subcomponente particular del mismo. Para facilitar la separación de componentes unidos y no unidos, es conveniente inmovilizar la diana sobre un soporte sólido. Los fagos que portan un resto de unión a TNFR2 pueden formar un complejo con la diana en el soporte sólido, mientras que los fagos que no se unen permanecen en solución y se pueden eliminar con un exceso de tampón. A continuación, los fagos unidos se pueden liberar de la diana cambiando el tampón a un pH extremo (pH 2 o pH 10), cambiando la fuerza iónica del tampón, añadiendo desnaturizantes u otros medios conocidos. Para aislar los fagos de unión que presentan los polipéptidos de la presente invención, se realiza una elución de proteínas.

A continuación, los fagos recuperados se pueden amplificar a través de infección de células bacterianas y se puede repetir el procedimiento de cribado con el nuevo conjunto que ahora está empobrecido en anticuerpos que no se unen y enriquecido en anticuerpos que se unen al péptido diana. La recuperación de incluso unos pocos fagos de unión es suficiente para amplificar el fago para una iteración posterior del cribado. Después de algunos ciclos de selección, se determinan las secuencias génicas que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos derivados de clones de fagos seleccionados en el conjunto de unión mediante procedimientos convencionales, revelando por tanto la secuencia peptídica que aporta afinidad de unión del fago a la diana. Durante el proceso de barrido, la diversidad de secuencia de la población disminuye con cada ciclo de selección hasta que permanecen los anticuerpos de unión a péptidos deseables. Las secuencias pueden converger en un pequeño número de anticuerpos relacionados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, típicamente 10-50 de los aproximadamente 10^9 a 10^{10} candidatos originales de cada colección. Un incremento en el número de fagos recuperados en cada ciclo de selección es un buen indicador de que se ha producido convergencia de la colección en un cribado. Después de identificar un conjunto de polipéptidos de unión, se puede usar la información de la secuencias para diseñar otras colecciones de fagos secundarias, sesgadas para miembros que tengan propiedades deseadas adicionales (véase el documento WO 2014/152660).

Ejemplo 4. Tratamiento del cáncer en un paciente humano mediante la administración de anticuerpos antagonistas anti-TNFR2

Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden administrar a un paciente humano para tratar un trastorno de proliferación celular, tal como cáncer. La administración de estos anticuerpos suprime el crecimiento y la proliferación de una población de linfocitos T-reg. Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar a un paciente para suprimir una respuesta inmunitaria mediada por T-reg. Por ejemplo, un paciente humano que padece cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito en el presente documento, puede recibir tratamiento mediante administración de un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención mediante una vía apropiada (por ejemplo, por vía intravenosa) a una dosis particular (por ejemplo, entre 0,001 y 100 mg/kg/día) en el transcurso de días, semanas, meses o años. Si se desea, el anticuerpo anti-TNFR2 se puede modificar, por ejemplo, mediante hiperglucosilación o mediante conjugación con PEG, para eludir el reconocimiento inmunitario y/o mejorar el perfil farmacocinético del anticuerpo.

La progresión del cáncer tratado con un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención se puede monitorizar mediante uno cualquiera o más de varios procedimientos establecidos. Un médico puede monitorizar al paciente mediante observación directa para evaluar cómo han cambiado los síntomas que presenta el paciente en respuesta al tratamiento. Un paciente también puede ser sometido a RMN, tomografía computarizada o análisis PET para determinar si un tumor ha metastatizado o si el tamaño de un tumor ha cambiado, por ejemplo, disminuido en respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención. Opcionalmente, se pueden extraer células del paciente y se puede llevar a cabo un análisis bioquímico cuantitativo para determinar las concentraciones relativas en la superficie celular de diversos receptores del factor de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. En base a los resultados de estos análisis, un médico puede prescribir dosis más altas o más bajas o dosificaciones más o menos frecuentes del anticuerpo antagonista del TNFR2 en ciclos de tratamiento posteriores.

Ejemplo 5. Producción de un scFv antagonista del TNFR2

Los fragmentos de anticuerpos de la invención incluyen fragmentos scFv, que consisten en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo combinadas en una única cadena peptídica. Se puede usar un anticuerpo contra TNFR2 como marco para el desarrollo de un fragmento de anticuerpo scFv expresando recombinantemente un polinucleótido que codifica la región variable de una cadena ligera del anticuerpo contra TNFR2 (por ejemplo, TNFRAB1) enlazada de forma funcional a la región variable de una cadena pesada de ese anticuerpo. Esto se puede lograr usando protocolos de mutagénesis establecidos como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica. Este polinucleótido se puede expresar a continuación en una célula (por ejemplo, una célula CHO) y posteriormente se puede aislar el fragmento scFv del medio de cultivo celular.

De forma alternativa, los fragmentos scFv derivados de un antagonista del TNFR2 se pueden producir mediante procedimientos de síntesis química (por ejemplo, mediante síntesis de péptidos en fase sólida basada en Fmoc, como se describe en el presente documento). Un experto en la técnica puede sintetizar químicamente una cadena peptídica que consiste en la región variable de una cadena ligera del anticuerpo contra TNFR2 (por ejemplo, TNFRAB1) enlazada de forma funcional a la región variable de una cadena pesada de ese anticuerpo. Se puede usar la unión química natural como estrategia para la síntesis de péptidos largos (por ejemplo, de más de 50 aminoácidos). Los protocolos de unión química natural son conocidos en la técnica y se han descritos, por ejemplo, por Dawson et al. (Science, 266:776-779, 1994).

Ejemplo 6. Producción de un anticuerpo contra TNFR2 humanizado

Un procedimiento para producir anticuerpos contra TNFR2 humanizados de la invención es importar las CDR de un anticuerpo contra TNFR2 en una secuencia consenso de anticuerpo humano. Las secuencias consenso de las

5 cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la base de
datos de secuencias de la línea germinal humana "VBASE"; Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological
Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE. UU., publicación de los NIH n.º 91-
3242, 1991); Tomlinson et al. (J. Mol. Biol. 227:776-798, 1992); y Cox et al. (Eur. J. Immunol. 24:827- 836, 1994)).
10 Usando procedimientos establecidos, se pueden identificar los residuos estructurales del dominio variable y las
CDR de una secuencia de anticuerpo consenso (por ejemplo, mediante alineación de secuencias (véase Kabat,
supra)). Se pueden sustituir una o más CDR de los dominios variables de la cadena pesada y/o de la cadena ligera
del anticuerpo humano consenso por una o más CDR correspondientes de TNFRAB1, u otro anticuerpo
antagonista del TNFR2 descrito en el presente documento, para producir una variante anti-TNFRAB1 humanizada
usando técnicas de edición génica descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Un ejemplo de
un dominio variable de un anticuerpo humano consenso incluye el dominio variable de la cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSIWVRQAPGKGLEWVAVISENGSDTYADSVKGR
FTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGGAVSFYFDVWGQGTLTVTSS (SEQ ID NO: 32)

15 y el dominio variable de la cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLESGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQYNLPTFTFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO: 33).

20 identificado en la patente de EE. UU. n.º 6.054.297 (las CDR se muestran en negrita).

Para producir anticuerpos contra TNFR2 humanizados, se puede expresar de forma recombinante un
polinucleótido que codifica la secuencia consenso anterior en la que una o más CDR de la región variable se han
reemplazado por una o más secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo específico para TNFR2.
25 Por ejemplo, las CDR 1-3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo humano consenso se pueden
reemplazar por las CDR 1-3 que tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 23-25, respectivamente, y las CDR 1-3 de
los dominios variables de la cadena ligera del anticuerpo humano consenso se pueden reemplazar por las CDR 1-
3 que tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 26-28, respectivamente.

30 Un polinucleótido que codifica los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera anteriores
enlazados de forma funcional entre sí se puede incorporar en un vector de expresión (por ejemplo, un vector de
expresión optimizado para la expresión de proteínas en células procariotas o eucariotas, como se describe en el
presente documento o se conoce en la técnica). Por tanto, el fragmento de anticuerpo monocaténario (scFv) se
puede expresar en una célula huésped y posteriormente purificar del medio de la célula huésped usando técnicas
establecidas, tales como cromatografía de exclusión por tamaño y/o cromatografía de afinidad como se describe
35 en el presente documento.

Ejemplo 7. Tratamiento de la infección por VIH en un paciente humano mediante la administración de anticuerpos antagonistas anti-TNFR2

40 Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden administrar a un paciente humano para tratar
una infección vírica, tal como infección por VIH. La administración de estos anticuerpos suprime el crecimiento y
la proliferación de una población de linfocitos T-reg, lo que potencia la respuesta inmunitaria de un paciente al
permitir el crecimiento y la proliferación de linfocitos T citotóxicos que pueden atacar a las células infectadas. Por
ejemplo, un paciente humano que padece infección por VIH puede recibir tratamiento mediante administración de
45 un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une
específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-
146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de
TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo contra
TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1) mediante una vía apropiada
50 (por ejemplo, por vía intravenosa) a una dosis particular (por ejemplo, entre 0,001 y 100 mg/kg/día) en el transcurso
de días, semanas, meses o años. Si se desea, el anticuerpo anti-TNFR2 se puede modificar, por ejemplo, mediante
hiperglucosilación o mediante conjugación con PEG, para eludir el reconocimiento inmunitario y/o mejorar el perfil
farmacocinético del anticuerpo.

55 La progresión de la infección por VIH tratada con un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención se puede
monitorizar mediante uno cualquiera o más de varios procedimientos establecidos. Un médico puede monitorizar
al paciente mediante observación directa para evaluar cómo han cambiado los síntomas que presenta el paciente
en respuesta al tratamiento. También se puede extraer una muestra de sangre del paciente para analizar el
recuento de células de uno o más glóbulos blancos para determinar si la cantidad de células infectadas ha
60 cambiado (por ejemplo, disminuido) en respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención. En

base a los resultados de estos análisis, un médico puede prescribir dosis más altas o más bajas o dosificaciones más o menos frecuentes del anticuerpo antagonista del TNFR2 en ciclos de tratamiento posteriores.

Ejemplo 8. Tratamiento de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* en un mamífero no humano mediante la administración de anticuerpos antagonistas anti-TNFR2

Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 de la invención se pueden administrar a un mamífero no humano (por ejemplo, un mamífero bovino, cerdo, bisonte, caballo, oveja, cabra, vaca, gato, perro, conejo, hámster, cobaya u otros . mamíferos no-humanos) para tratar una infección bacteriana, tal como la de *Mycobacterium tuberculosis*. La administración de estos anticuerpos suprime el crecimiento y la proliferación de una población de linfocitos T-reg, lo que potencia la respuesta inmunitaria de un paciente al permitir el crecimiento y la proliferación de linfocitos T citotóxicos que pueden atacar al organismo patógeno. Por ejemplo, un mamífero no humano que padece infección por *Mycobacterium tuberculosis* puede recibir tratamiento mediante administración de un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención (por ejemplo, un anticuerpo contra TNFR2 que se une específicamente a un epítipo que contiene uno o más residuos de la secuencia KCRPG de TNFR2 (residuos 142-146 de SEQ ID NO: 7) y que no presenta unión específica a un epítipo que contiene la secuencia KCSPG de TNFR2 (residuos 56-60 de SEQ ID NO: 7) y tiene una región constante no natural, tal como un anticuerpo contra TNFR2 que contiene una o más CDR o una variante de las mismas de TNFRAB1) mediante una vía apropiada (por ejemplo, por vía intravenosa) a una dosis particular (por ejemplo, entre 0,001 y 100 mg/kg/día) en el transcurso de días, semanas, meses o años. Si se desea, el anticuerpo anti-TNFR2 se puede modificar, por ejemplo, mediante hiperglicosilación o mediante conjugación con PEG, para eludir el reconocimiento inmunitario y/o mejorar el perfil farmacocinético del anticuerpo.

La progresión de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* tratada con un anticuerpo antagonista del TNFR2 de la invención se puede monitorizar mediante uno cualquiera o más de varios procedimientos establecidos. Un médico puede monitorizar al paciente mediante observación directa para evaluar cómo han cambiado los síntomas que presenta el paciente en respuesta al tratamiento. También se puede extraer una muestra de sangre del paciente para analizar el recuento de células de uno o más glóbulos blancos para determinar si la respuesta inmunitaria ha cambiado (por ejemplo, se ha incrementado) en respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-TNFR2 de la invención. En base a los resultados de estos análisis, un médico puede prescribir dosis más altas o más bajas o dosificaciones más o menos frecuentes del anticuerpo antagonista del TNFR2 en ciclos de tratamiento posteriores.

Ejemplo 9. Anticuerpos antagonistas del TNFR2 que inhiben la proliferación de linfocitos T-reg en presencia de IL-2 y TNF

La presencia de una cantidad elevada de linfocitos T-reg puede menoscabar la capacidad del sistema inmunitario para combatir el cáncer y las enfermedades infecciosas. TNFR2 representa un punto de control importante en la proliferación de T-reg y, por tanto, constituye una diana ideal para la inmunomodulación. Para caracterizar la actividad funcional de dos anticuerpos monoclonales (mAb) antagonistas del TNFR2, TNFRAB1 y TNFRAB2, se empleó un ensayo basado en células desarrollado para la expansión homogénea de T-reg. Se confirmó primero que las células CD4⁺ humanas normales incubadas con concentraciones crecientes de TNF α daban como resultado un incremento de los linfocitos T-reg dependiente de la dosis (figuras 6A y 7A). También se confirmó que la presencia de IL-2 es necesaria para la proliferación de T-reg (figura 6B). Como se muestra en las figuras 6B-6G, con respecto al tratamiento con IL-2 sola, el efecto sobre la proliferación de T-reg con TNF a 20 ng/ml es muy importante (>20 % de expansión) y se potencia aún más mediante la coincubación con el agonista del TNFR2 (>60 % de expansión).

Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 provocan un efecto opuesto sobre la proliferación de T-reg, como se mide usando este ensayo. Ambos anticuerpos antagonistas del TNFR2 indujeron efectos supresores sobre la proliferación de T-reg que dieron como resultado una disminución de un 4-15 % en el porcentaje de linfocitos T-reg restantes en donantes de sangre normales. Extraordinariamente, el efecto de antagonismo del TNFR2 es dominante y puede incluso contrarrestar la presencia de una cantidad generosa de TNF α (20 mg/ml) (figuras 6C-6G). El efecto de antagonismo del TNFR2 en los T-reg fue dependiente de la dosis (figuras 6D-6G). Más extraordinaria fue la observación de que, cuando los dos anticuerpos antagonistas del TNFR2 se estudiaron en presencia de TNF α , ambos anticuerpos antagonistas del TNFR2 pudieron contrarrestar el agonismo de TNF α de una manera dependiente de la dosis. Ambos anticuerpos antagonistas pudieron atenuar la expansión de T-reg e invertir la curva agonista de TNF α (figuras 6A y 6C-6G). Este ensayo también se realizó incubando linfocitos T-reg con una cantidad fija de anticuerpo antagonista del TNFR2 y dosis crecientes de TNF α (figuras 6D-6G). Nuevamente, ambos antagonistas del TNFR2 pudieron revertir el agonismo de TNF α de forma dosis dependiente. Cabe destacar que este ensayo de expansión de T-reg de 48 horas se realiza con IL-2, un agonista, en el cultivo para evitar la muerte de linfocitos T CD4⁺ humanos no específicos. Cuando se procesaron los datos obtenidos de estos experimentos para determinar los cambios relativos en la proliferación de T-reg en presencia de anticuerpos antagonistas del TNFR2 en comparación con la presencia de IL-2 sola, las propiedades antagonistas de ambos anticuerpos persistieron (figuras 7A-7E). Tomados conjuntamente, estos resultados demuestran la capacidad funcional de dos anticuerpos antagonistas del TNFR2 para suprimir la proliferación de T-reg en células CD4⁺

humanas, y el efecto es extraordinariamente dominante sobre el agonismo impulsado por dosis moderadas a altas de TNF α .

Para llevar a cabo los ensayos de supresión de T-reg descritos anteriormente, se usaron leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) como indicadores de respuesta. Se aislaron PBMC el día de la venopunción usando un gradiente de densidad Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se criopreservaron a -80 °C. Se descongelaron las células un día antes de mezclarlas con linfocitos T-reg y se dejaron reposar durante la noche en RPMI 1640 e IL-2 (10 U/ml). Al día siguiente, las células que mostraron respuesta se tiñeron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) 1 μ M. A continuación, se mezclaron las células que mostraron respuesta (5×10^4 células) con linfocitos T-reg expandidos en diversas proporciones (0:1, 4:1, 2:1, 1:1) y se estimularon con mAb anti-CD3 (HIT3a, BD Biosciences) e IL-2 (50 U/ml). Se recogieron las células después de 4 días y se analizaron mediante citometría de flujo.

Sujetos humanos

Se recogieron muestras de sangre humana de más de 100 donantes de acuerdo con un protocolo de estudios en humanos aprobado por el Comité de Estudios en Humanos del Hospital General de Massachusetts (MGH-2001P001379). Todos los donantes dieron su consentimiento informado por escrito. La sangre se recogió en tubos BD Vacutainer EDTA (BD Diagnostics) y se procesó dentro de las 2 horas posteriores a la flebotomía. Se obtuvieron muestras de T-reg aisladas de pacientes con cáncer de ovario de mujeres con cáncer de ovario recién diagnosticado antes de la irradiación y antes de la quimioterapia. Estos estudios en humanos fueron aprobados por el Comité de Estudios en Humanos del Hospital General de Massachusetts (MGH-2015P002489; véase el ejemplo 14 a continuación).

Sangre y cultivos celulares

Se procesó sangre humana recién extraída dentro de las 2 horas posteriores a la venopunción. Se lavó la sangre dos veces con HBSS 1x (Invitrogen) más FBS al 2 % (Sigma-Aldrich) y se aislaron las células CD4+ usando el kit de aislamiento de células CD4+ Dynabeads® (Invitrogen). Se resuspendieron las células CD4+ aisladas en RPMI GlutaMAX™ (Life Technologies) más FBS al 10 % (Sigma-Aldrich) y penicilina-estreptomycin al 1 % (Life Technologies). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos de fondo redondo a una concentración de $0,2-1 \times 10^6$ células/pocillo, se trataron con anticuerpos antagonistas del TNFR2 o con agonistas del TNFR2 (como se indica en cada ejemplo) y, a continuación, se incubaron durante hasta 48 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Dado que los linfocitos T humanos aislados y cultivados mueren en ausencia de IL-2 en el medio de cultivo celular, todos los experimentos basados en células descritos en el presente documento usaron un nivel bajo de IL-2 (100 U/ml) en los medios de cultivo para evitar que la retirada de IL-2 influyera en los datos. Se obtuvieron linfocitos T-reg aislados de ascitis de cáncer de ovario estériles concentrando primero las células en tubos cónicos de 50 ml y suspendiendo a continuación los sedimentos celulares para obtener aislados de células CD4+ (véase el ejemplo 14 a continuación).

Reactivos y citometría de flujo

Se adquirió el TNF humano recombinante de Sigma-Aldrich y se adquirió la IL-2 humana recombinante de Life Technologies. Se prepararon los fragmentos F(ab')₂ de TNFRAB1 y TNFRAB2 usando el kit de preparación Pierce F(ab')₂ (Life Technologies). Se adquirieron los anticuerpos reticulantes contra IgG de roedor (ab9165 y ab99670) de Abcam (Cambridge, MA). Se prepararon las células para citometría de flujo usando el kit Human T-reg Flow™ (BioLegend) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos usados para la citometría de flujo incluyeron Alexa Fluor® 488 anti-FOXP3 humano, clon 259D para la tinción intracelular de FOXP3 y PE anti-CD25 humano, clon BC96 para la tinción de la superficie celular de CD25 (BioLegend). Se resuspendieron las células teñidas fluorescentemente en HBSS 1x (Invitrogen) y se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Calibur (Becton Dickinson). Se procesaron los datos de FACS usando el programa informático FlowJo (versión 10.0.8).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de datos mediante la prueba de la *t* de Student para datos emparejados usando Excel (Microsoft) o el programa informático GraphPad Prism-5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Se determinó la importancia mediante un valor de *p* bilateral inferior a 0,05.

Ejemplo 10. Efectos del cultivo a corto plazo sobre linfocitos T-reg activados por anticuerpos antagonistas del TNFR2

Para investigar la capacidad de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 para modular la secreción de TNFR2, se midió el TNFR2 humano soluble en sobrenadantes de cultivos celulares usando ELISA Quantikine® (R&D Systems). En resumen, se recogieron los sobrenadantes después de 24-42 horas de incubación de células CD4+ con IL-2 (200 U/ml) sola o con TNF (20 ng/ml) o anticuerpos antagonistas del TNFR2 (12,5 μ g/ml) y se usaron de inmediato o bien se congelaron a -20 °C. El ELISA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la

absorbancia usando el lector de absorbancia de placas SpectraMax® 190 y se analizó con SoftMax Pro 6.3 (Molecular Devices).

Los linfocitos T-reg existen en dos estados, activados (aT-reg) y en reposo (rT-reg); los dos estados se pueden distinguir en base a la expresión de CD45RA. El fenotipo de un linfocito aT-reg es CD25^{Hi} CD45RA^{Low}, mientras que el fenotipo de un linfocito rT-reg es CD25^{Med} CD45RA^{Hi}. Los linfocitos aT-reg son supresores más potentes de la función inmunitaria y, por lo tanto, dianas ideales para la inmunoterapia. Para investigar la eficacia de la inhibición de linfocitos aT-reg, se confirmó primero que el número total de linfocitos T-reg, en lugar de simplemente la proporción de linfocitos T-reg, se reducía cuando las células CD4+ se trataban con los antagonistas del TNFR2 (figuras 8A-8H). A continuación, para determinar qué clase de T-reg inhiben los antagonistas del TNFR2, se tiñeron las células con CD45RA. Se descubrió que, si bien se inhiben ambas clases de linfocitos T-reg, los linfocitos aT-reg se suprimieron en mayor medida que los linfocitos rT-reg. Estos datos sugieren que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 inhiben selectivamente la proliferación de linfocitos aT-reg. La alta expresión de TNFR2 es otra característica de los linfocitos T-reg supresores. Se midió el nivel de expresión de TNFR2 y se descubrió que el tratamiento con antagonistas del TNFR2 reducía el número de células que expresaban TNFR2^{Hi}. Por el contrario, la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de TNFR2 se mantuvo similar entre todos los tratamientos (figura 9A). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que los anticuerpos antagonistas del TNFR2, tales como TNFRAB1 y TNFRAB2, pueden atenuar selectivamente la proliferación de linfocitos T-reg CD25^{Hi}+, CD45RA^{Low}+

La respuesta inmunitaria se caracteriza a menudo por un incremento del TNFR2 soluble debido a un alto recambio de proteínas en las células. Por lo tanto, se midió el nivel de TNFR2 soluble en el sobrenadante de cultivo después del tratamiento con agentes moduladores del TNFR2 para determinar el efecto de estas moléculas sobre la actividad inmunitaria. Se observó que el TNF y el agonista del TNFR2 incrementaban la cantidad de TNFR2 soluble, mientras que el antagonista del TNFR2 reducía el nivel de TNFR2 soluble (figura 9B). Además, los ensayos de supresores de T-reg confirmaron una potente supresión de células CD8+ por el antagonismo de TNFR2 (figuras 9A y 9C). Estos datos demuestran que el tratamiento de células CD4+ humanas con un antagonista del TNFR2 reduce eficazmente el número de linfocitos T-reg activados y altamente supresores y tiene el beneficio adicional de inhibir la secreción de TNFR2 soluble.

Para llevar a cabo ensayos de supresión de T-reg como se describe anteriormente, se usaron leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) como indicadores de respuesta. Los PBMC se aislaron el día de la venopunción usando un gradiente de densidad Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se criopreservaron a -80 °C. Los PBMC se descongelaron el día antes de mezclarlos con linfocitos T-reg y se dejaron reposar durante la noche en RPMI 1640 e IL-2 (10 U/ml). Al día siguiente, las células que mostraron respuesta se tiñeron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) 1 µM. A continuación, se mezclaron las células que mostraron respuesta (5 x 10⁴ células) con linfocitos T-reg expandidos en diversas proporciones (0:1, 4:1, 2:1, 1:1) y se estimularon con mAb anti-CD3 (HIT3a, BD Biosciences) e IL-2 (50 U/ml). Se recogieron las células después de 4 días y se analizaron mediante citometría de flujo.

Para medir la concentración de TNFR2 secretado como se describe anteriormente, se usó el kit de ensayo ELISA QUANTIKINE® (R&D Systems). En resumen, se recogieron los sobrenadantes después de 24-42 horas de incubación de células CD4+ con IL-2 (200 U/ml) sola o con TNFα (20 ng/ml) o anticuerpos antagonistas del TNFR2 (12,5 µg/ml) y se usaron de inmediato o bien se congelaron a -20 °C. Los ensayos ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia usando el lector de absorbancia de placas SPECTRAMAX® 190 y se analizó con SoftMax Pro 6.3 (Molecular Devices).

Ejemplo 11. La actividad antagonista del TNFR2 es independiente de la reticulación o unión no específica de regiones Fc

La unión no específica de regiones Fc del anticuerpo puede dar como resultado una actividad funcional arbitraria. El tratamiento de células CD4+ con fragmentos F(ab')₂ de mAb contra TNFR2, con o sin TNF, dio como resultado respuestas a dosis en cantidades de linfocitos T-reg similares a las observadas con anticuerpos monoclonales completos (figuras 10A-10D). Esto confirma que la unión específica por la región F(ab')₂ del anticuerpo antagonista del TNFR2 a TNFR2, en lugar de la unión no específica mediada por la región Fc, es probablemente responsable de la actividad supresora. La pureza de los fragmentos F(ab')₂ y los anticuerpos completos se evaluaron mediante análisis SDS-PAGE (figuras 11A-11D).

La reticulación también puede dar como resultado una actividad funcional anómala de los anticuerpos. Para descartar la posibilidad de que la reticulación no específica fuera una causa de la actividad funcional observada, se realizó un ensayo de respuesta a la dosis en el que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 se incubaron con linfocitos T-reg con y sin anticuerpos anti-IgG. La supresión dependiente de la dosis de linfocitos T-reg por anticuerpos antagonistas del TNFR2 no se vio afectada por la presencia de anti-IgG (figuras 10C y 10D). Tomados conjuntamente, estos datos confirman que la actividad funcional de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 es independiente de la actividad o reticulación de la región Fc no específica.

Para realizar el análisis SDS-PAGE descrito anteriormente, se procesaron muestras de proteínas junto con marcadores PRECISION PLUS™ (BioRad) o PERFECT PROTEIN™ (EMD Millipore) en geles NuPAGE con Bis-Tris al 4-12 % con tampón de migración MOPS SDS (Life Technologies) a 100 V durante 1 hora. Los geles se tiñeron durante 24 horas con SIMPLY BLUE™ Safe Stain (Invitrogen).

Ejemplo 12. Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 inhiben la activación y la expresión génica de NFκB

La señalización de NFκB es necesaria para la respuesta celular mediada por TNF y se ha propuesto como una diana potencial para el tratamiento del cáncer. Tras observar una disminución en la proliferación de linfocitos T-reg después del tratamiento con anticuerpos antagonistas del TNFR2, se planteó la hipótesis de que el mecanismo de señalización subyacente implicaría una reducción en la activación de NFκB. Para investigar la respuesta molecular al antagonismo de TNFR2, se midió la expresión de ocho promotores de activación de NFκB mediante análisis de PCR en tiempo real. Estas proteínas incluían: CHUK, NFKBIE, KNKBIA, MAP3K11, TRAF2, TRAF3, relB, cIAP2/BIRCH. Adicionalmente, se monitorizó la expresión de TNF y linfotóxina, así como de dos marcadores de linfocitos T-reg, FoxP3 y CD25. En cada caso, el tratamiento con TNFRAB2 dio como resultado una regulación por disminución de la expresión génica en comparación con el tratamiento con TNF (figuras 12A y 12B). A continuación, usando RelA/NFκB p65 fosforilado como marcador, se demostró que el tratamiento de células CD4+ con cualquiera de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 reducía la activación de NFκB, mientras que el tratamiento con TNF incrementaba la activación de NFκB (figuras 12C-12E). Esto sugiere que el efecto de los dos anticuerpos antagonistas del TNFR2 sobre la transducción de señales de TNFR2 es muy similar. Adicionalmente, el análisis de los parámetros cinéticos de unión de anticuerpos antagonistas del TNFR2 a TNFR2 recombinante humano reveló que no existía una diferencia significativa en las velocidades de asociación o disociación entre TNFRAB1 y TNFRAB2 (figura 13A).

Para llevar a cabo los ensayos de expresión génica, se incubaron células CD4+ aisladas durante 3 horas en presencia de IL-2 (50 U/ml) y TNFα (20 ng/ml) o de anticuerpo antagonista del TNFR2 (2,5 μg/ml). Se recogieron las células y se aisló el ARN total usando el kit RNAqueous-4PCR (Ambion). Se transcribió de forma inversa el ARN total usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied-Biosystems). Se realizó la PCR en tiempo real usando la placa de 96 pocillos TaqMan® Array Human NFκB Pathway con la mezcla maestra de expresión génica TaqMan® y el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 (Applied-Biosystems).

Se midió la activación de NFκB usando el inmunoensayo de fosfo-RelA/NFκB p65 basado en células (R&D Systems). En resumen, se cultivaron células CD4+ recientes en placas de 96 pocillos de fondo plano (0,2 x 10⁶ células/pocillo) en presencia de IL-2 (200 U/ml) sola o en presencia de TNF o antagonistas de TNFR2 a las concentraciones indicadas durante 10 minutos a 37 °C. Las células se adhirieron a la placa mediante centrifugación y fijación y, a continuación, se tiñeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se leyó la fluorescencia usando el lector de placas multietiqueta EnVision® (Perkin Elmer) y se calcularon las unidades de fluorescencia relativa (UFR) normalizadas.

Ejemplo 13. Unión de anticuerpos antagonistas del TNFR2 a mapas de TNFR2 en regiones superpuestas

Para investigar adicionalmente las propiedades de unión específica de los anticuerpos antagonistas del TNFR2 TNFRAB1 y TNFRAB2, se realizó un análisis de mapeo de epítomos y se correlacionaron los epítomos dentro del TNFR2 humano que se unen a estos anticuerpos con una localización específica en la superficie del receptor. El mapeo lineal de péptidos de los dos antagonistas del TNFR2 reveló que, si bien ambos anticuerpos antagonistas presentan una alta afinidad por la proteína diana de longitud completa, estos anticuerpos presentan afinidad diferente por los péptidos lineales. Específicamente, TNFRAB1 presentó afinidad moderada por el epítipo que contiene los aminoácidos 112-139 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano, y presentó una fuerte afinidad por el epítipo que contiene los aminoácidos 128-155 de SEQ ID NO: 7. TNFRAB2 no se unió a ninguna región peptídica lineal (figura 13B). La afinidad de TNFRAB1 por TNFR2 no se vio perturbada por la presencia de TNFα, lo que indica que TNFα no compite con este anticuerpo por la unión a TNFR2 (figura 13C). Para examinar los epítomos conformacionales que se unen a los dos anticuerpos antagonistas, se llevó a cabo un análisis de unión tridimensional. Para TNFRAB1, los datos 3D concordaron con el análisis de mapeo lineal de péptidos e indicaron que la región de los aminoácidos 142-149 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano se unió a TNFRAB1 con alta afinidad. Adicionalmente, el análisis 3D reveló una nueva región de unión en los aminoácidos 161-169 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano (figuras 13A-13C y 15A-15C). Para TNFRAB2, aunque no hubo unión peptídica lineal exitosa, se mapearon cuatro regiones de unión mediante análisis 3D (figuras 15A-15C). De forma interesante, existía una superposición parcial en los epítomos discontinuos precisos de los dos anticuerpos antagonistas del TNFR2 en los aminoácidos 142-144 de SEQ ID NO: 7 dentro del TNFR2 humano.

Estos últimos datos fueron de interés, ya que se los intentos previos de generar anticuerpos antagonistas del TNFR2 contra el sitio de unión de TNFR2 del complejo de señalización del trimero de TNFR2 y/o la región exterior del sitio de unión del trimero para evitar la entrada de TNFα y evitar la estabilización del trimero de TNF habían fracasado. La estructura en solución de los complejos de TNFα y TNFR2 había definido un homotrímero central de TNFα rodeado por tres receptores TNFR2 (Mukai et al. Science Signaling 3: ra83 (2010)). Esta disposición también se había observado en muchos miembros de la superfamilia de TNF previos, incluyendo TNFR1 con

linfotóxina, DR5 con ligando TRAIL y el receptor Ox40 con Ox40L (Banner et al. Cell 73: 431-445 (1993); Cha et al. J. Biol. Chem. 275: 31171-31177 (2000); Compaan et al. Structure 14:1321-1330 (2006); Hymowitz et al. Mol. Cell 4:563-571 (1999); Mongkolsapaya et al. Nat. Struct. Biol. 6:1048-1053 (1999)).

Los intentos previos de producir anticuerpos antagonistas para estas regiones para evitar la unión de TNF α y los trímeros de TNFR2 proporcionaron anticuerpos antagonistas recesivos con actividad inhibidora de TNFR2 leve que tenían un rasgo común en los ensayos de proliferación de T-reg. Como muestran las figuras 14A-14D, en el ensayo de T-reg de 48 horas, estos anticuerpos antagonistas recesivos se comportaron como antagonistas en ausencia de un agente estimulante de TNFR2. De hecho, ambos anticuerpos A y B antagonistas recesivos de TNFR2 por sí mismos demostraron antagonismo de T-reg de respuesta a la dosis con una respuesta a la dosis de 0-25 μ g/ml (figuras 14A y 14C). Es importante destacar que, cuando se añadió TNF α (20 mg/ml) a los cultivos, estos anticuerpos A y B antagonistas recesivos dirigidos a TNFR2 compitieron escasamente con TNF α . En cada caso, el agonismo impulsado por TNF α fue dominante sobre esta forma de antagonismo, al menos el antagonismo parcial y débil con anticuerpos para evitar la formación de trímeros de TNFR2 o TNF α (figura 15C). Este comportamiento contrasta con la capacidad de los anticuerpos antagonistas dominantes de TNFR2, tales como TNFRAB1 y TNFRAB2, que se unen a los epítomos específicos dentro de TNFR2 identificados y descritos en el presente documento, tales como epítomos que contienen el motivo KCRPG de TNFR2 y otros epítomos identificados en las descripciones de TNFRAB1 y TNFRAB2 proporcionados en el presente documento. A diferencia de los anticuerpos A y B antagonistas recesivos de TNFR2, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 TNFRAB1 y TNFRAB2 presentaron la capacidad de atenuar la señalización de TNFR2 y la proliferación de T-reg incluso en presencia de un agonista del TNFR2, tal como TNF α e IL-2. Es importante destacar que los epítomos identificados en el presente documento se pueden usar para generar anticuerpos antagonistas del TNFR2 que presenten un efecto antagonista que persista en presencia de estimulantes de TNFR2.

Dado que el mapeo lineal de péptidos solo respondió parcialmente a la pregunta de por qué TNFRAB1 y TNFRAB2 eran antagonistas superiores, a continuación se exploró la identificación de epítomos conformacionales de los dos antagonistas del TNFR2. Se llevaron a cabo análisis de unión tridimensionales (3D) usando la tecnología Pepscan (Pepscan, Países Bajos). Tanto para TNFRAB1 como para TNFRAB2, los datos 3D mostraron regiones superpuestas de aproximadamente 138 a 150 aminoácidos. Lo que se hizo evidente es que estas regiones de unión no parecían poder unirse al trímero de TNFR2 clásico con TNF α trimérico, ya que el sitio habría estado en el interior del trímero (figura 15B). Dado que otros grupos de investigación habían informado de formas alternativas de formas independientes de TNF de miembros de la superfamilia de TNF que eran modelos paralelos o antiparalelos, se mapearon los epítomos en esos sitios (Naismith et al. J. Biol. Chem. 270:13303-13307 (1995); Naismith et al. Structure 4:1251-1262 (1996)). Sorprendentemente, solo un modelo de unión antagonista del TNFR2 fue óptimo: un modelo en el que el dímero antiparalelo (figura 15A) contiene dos regiones de unión de anticuerpos antagonistas del TNFR2 que están espaciadas para los antagonistas del TNFR2 articulados obligatorios y que parecerían estabilizar este complejo independiente de TNF α , otro rasgo funcional de estos anticuerpos. Con un modelado adicional, fue evidente que el complejo antiparalelo, pero no el complejo de dímero paralelo, tendría regiones intracelulares distantes entre sí e inhibiría la señalización de NF κ B como se había observado en los ensayos funcionales. Dado que todos los miembros de la superfamilia de receptores de TNF pueden presentar estas conformaciones antiparalelas menos comúnmente estudiadas, se pueden preparar anticuerpos antagonistas para cualquier receptor de la superfamilia de TNFR diseñando o cribando anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a epítomos expuestos a la superficie dentro de la proteína antiparalela miembro de la TNFRS (véase, por ejemplo, el ejemplo 15 a continuación). Estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden estabilizar las formas antiparalelas de estas proteínas y evitar por tanto la señalización, así como la formación de formas triméricas activas de estos receptores que con frecuencia también se unen a ligandos afines solubles. Los miembros conocidos de la superfamilia de receptores de TNF que se sabe que presentan estructuras de dímeros antiparalelos incluyen: TNFR1, TNFR2, Fas, DCR3, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, DR6, EDAR, CD271, OPG, RANK, LT β R, TWEAK-R, HVEM, CD27, CD30, CD40, CD137, OX40, GITR, BCMA, TACI, BAFFR, EDAR2, TROY y RELT, entre otros.

Ejemplo 14. Actividad antagonista del TNFR2 en células cancerosas

Los linfocitos T-reg presentes en pacientes que padecen cáncer son potentes inmunosupresores. Esto es en particular cierto para los linfocitos T-reg de sitios tumorales en comparación con los linfocitos T-reg de sangre periférica de pacientes con cáncer o de sujetos de control. Para comenzar a comprender la potencia del anticuerpo antagonista del TNFR2 sobre los linfocitos T-reg de cáncer de ovario, se aislaron linfocitos T-reg de cáncer de ovario recientes y se caracterizó su proliferación como se describe en el ejemplo 2. Primero con TNF y a continuación con agonista del TNFR2, se dio el caso de que los linfocitos T-reg que residen en el cáncer de ovario se expandieron mucho más que los linfocitos T-reg de donantes normales, un signo de hiperactivación (figuras 16A-16B y 17A-17H). Los anticuerpos antagonistas del TNFR2 inhibieron la proliferación de linfocitos T-reg de una manera dependiente de la dosis y con mayor variabilidad en comparación con los datos ajustados de respuesta a la dosis obtenidos del análisis de proliferación de linfocitos T-reg aislados de donantes sanos. Además, ambos anticuerpos antagonistas inhibieron de forma más potente la proliferación de linfocitos T-reg aislados de pacientes con cáncer de ovario en comparación con donantes sanos.

Los experimentos descritos anteriormente demuestran que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden inhibir la proliferación tanto de linfocitos T-reg normales como asociados al cáncer. Dichos anticuerpos pueden eliminar o inactivar linfocitos T-reg supresores potentes, tanto en términos de cantidad de linfocitos T-reg en cultivo como en términos de proliferación de T-reg. Los rasgos de estos anticuerpos incluyen la capacidad de atenuar los acontecimientos de fosforilación temprana intracelular que preceden a la activación de NFkB y la capacidad de cambiar el fenotipo de los linfocitos T-reg restantes de modo que estas células expresen cantidades reducidas de marcadores de activación, tales como CD45RO. Adicionalmente, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden disminuir la secreción de TNFR2 soluble, una proteína proinflamatoria. Extraordinariamente, incluso en presencia de cantidades generosas de anticuerpos agonistas del TNF α o agonistas del TNFR2 añadidos a los medios de cultivo celular, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 siguen actuando como antagonistas dominantes.

Es interesante contrastar el agonismo de los anticuerpos o ligandos de los receptores de TNF α con el antagonismo de los anticuerpos. La necesidad del agonismo de TNF y de otros miembros de la superfamilia de TNF con los ligandos naturales está bien estudiada y requiere agregación y agrupamiento para una transducción eficiente de las señales (Das et al. *J. Mol. Endocrinol.* 53:81-91 (2014); Siegel et al. *J. Cell. Biol.* 167:735-744 (2004); Takeda et al. *Oncogene* 26:3745-3757 (2007)). La confirmación más común de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral es un receptor trimérico emparejado con trímeros del ligando (Gommerman et al. *Nat. Rev. Immunol.* 3:642-655 (2003); Loetscher et al. *J. Biol. Chem.* 266:18324-18329 (1991); Smith et al. *Cell* 76:959-962 (1994); Tartaglia *J. Biol. Chem.* 267:4304-4307 (1992); Ware *Annu. Rev. Immunol.* 23:787-819 (2005)). Los anticuerpos agonistas parecen seguir los mismos principios y a menudo también requieren las porciones Fc de sus receptores para las células asociadas a través de mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), algo que estabilizaría las redes extracelulares. Esta oligomerización y agrupamiento del receptor exterior observada con el agonista de TNFR2 permite la oligomerización interna de la red TRAF recíproca para una señalización enérgica de NFkB (Cabal-Hierro et al. *Cell Signal.* 26:2658-2666 (2014); Yin et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:658-666 (2009); Zheng et al. *Mol. Cell.* 38:101-113 (2010)). La estabilización del agonista también se ve favorecida por la cooperación del ligando añadido al receptor. Esto parece importante para la eficacia terapéutica de muchos miembros de la superfamilia de receptores de TNF (Graves et al. *Cancer Cell* 26:177-189 (2014)).

Las regiones de unión al receptor compartidas de los dos anticuerpos antagonistas del TNFR2 estudiados en el presente documento dan lugar a un modelo posible y muy diferente de unión de anticuerpos al receptor TNFR2 para provocar un antagonismo estable y dominante. La forma trimérica comúnmente estudiada de TNFR2 no permitiría que los antagonistas de anticuerpos recientemente identificados se unieran a sus secuencias de aminoácidos ni explicaría por qué estos anticuerpos antagonistas son dominantes sobre TNF α o IL-2 (Mukai et al. *Science Signal.* 3:ra83 (2010)). De hecho, años de trabajo generando anticuerpos contra TNFR2 para la región de unión de TNF α en la estructura del trímero de TNFR2 o para la superficie exterior de la región de unión a TNF α del trímero no generaron antagonistas potentes que mantuvieran una inhibición dominante de la señalización del receptor en presencia de agonistas del TNFR2. Los anticuerpos dirigidos al trímero de TNFR2 diseñados para competir con el TNF α no fueron dominantes, sino que, en ocasiones, presentaron efectos neutralizantes cuando se enfrentaron al entorno inflamatorio de TNF α o IL-2.

La forma trimérica de TNFR2 es la forma más comúnmente estudiada del receptor de TNF α , ya que se relaciona con señales de crecimiento celular que involucran NFkB. Estudios previos han propuesto que TNFR2 y miembros similares de la superfamilia de TNF α , como el receptor de linfotóxina, también pueden existir como formas paralelas y antiparalelas. Estas formas carecen del sitio de unión a TNF (Naismith et al. *J. Biol. Chem.* 270:13303-13307 (1995); Naismith et al. *Structure* 4:1251-1262 (1996)). Los datos descritos en el presente documento no demuestran ningún beneficio añadido por el hecho de añadir un reactivo de reticulación para aumentar el antagonismo o bien convertir el antagonismo en agonismo. Sería difícil imaginar que la unión con alta afinidad del TNF α al TNFR2 trimérico pueda ser inhibida competitivamente por un anticuerpo, incluso con una afinidad extremadamente alta. La forma dimérica antiparalela de TNFR2 es la que mejor se ajusta al sitio de unión evaluable para anticuerpos antagonistas y para el ensayo funcional, pero también existe otro rasgo característico que respalda esta observación: la interfaz exterior es considerablemente más extensa y, por tanto, esto también causaría que las colas intracelulares de TNFR2 estén a una distancia mayor, según lo respaldan otros datos (Naismith et al. *Structure* 4:1251-1262 (1996)). Con la trimerización de TNFR2, las regiones de señalización intracelular de TNFR2 se acercan, facilitando por tanto el reclutamiento directo o indirecto de TRAF de los dominios intracelulares de estos receptores de la superfamilia de TNF (Napetschnig et al. *Annu. Rev. Biophys.* 42:443-468 (2013); Yin et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:658-666 (2009)). Esta señal agonista involucraría posteriormente a otras proteínas de señalización para activar el inhibidor de la kB (I κ B) cinasa (IKK) y las MAP cinasas, activando finalmente NFkB. El hecho de que la vía de señalización posreceptor esté bloqueada en diversos grados con anticuerpos antagonistas del TNFR2 sugiere que el reclutamiento de TRAF intracelulares se inhibe por la estabilización dominante de la estructura exterior de TNFR2. Otros autores han propuesto previamente que los dímeros antiparalelos de TNFR1 podrían ser un complejo inhibidor y no se podrían unir al TNF (Naismith et al. *Structure* 4:1251-1262 (1996)). El modelo antiparalelo corrobora más estrechamente cómo la formación antagónica de este complejo explicaría la dominancia sobre el cocultivo de TNF, ya que no se pudieron formar nuevos trímeros de activación.

Vale la pena mencionar que, como informaron otros autores, los linfocitos T-reg en el entorno del cáncer son extremadamente potentes en comparación con los linfocitos T-reg de donantes sin cáncer o incluso con los linfocitos T-reg aislados de la sangre periférica de donantes con cáncer (Govindaraj et al. Clin. Cancer Res. 20: 724-735 (2013)). Como se describe en el presente documento, los anticuerpos antagonistas del TNFR2 pueden inhibir la proliferación de linfocitos T-reg potentes aislados de pacientes con cáncer de ovario. También se ha observado que los anticuerpos antagonistas del TNFR2 TNFRAB1 y TNFRAB2 logran una inhibición acentuada de los linfocitos T-reg aislados de pacientes con cáncer de ovario. Esta actividad es beneficiosa a la vista de informes recientes que identifican los rasgos característicos de la secuencia del gen de TNFR2 que aporta una potencia potenciada a la señalización de TNFR2 en pacientes con cáncer. En el contexto del linfoma cutáneo de linfocitos T, por ejemplo, el gen para TNFR2 es una duplicación génica y/o se puede mutar en la región intracelular para conferir agonismo constitutivo. Esta presión genética para mantener constantemente las señales de crecimiento de TNFR2 está en consonancia con un crecimiento exagerado.

Los anticuerpos antagonistas descritos en este documento se unen a las regiones restringidas del receptor TNFR2 que modulan la inhibición de T-reg e incluso la inhibición dominante en presencia de TNF α . Estos antagonistas son muy diferentes de los antagonistas recesivos también descritos en el presente documento que pueden inhibir levemente la proliferación de linfocitos T-reg pero, cuando se usan en un entorno inflamatorio de TNF e IL-2, domina el agonismo (figuras 14A-14D). Tomados conjuntamente, los datos descritos anteriormente proporcionan una nueva plataforma para la creación de anticuerpos antagonistas del TNFR2 adicionales más allá de los descritos en el presente documento que podrían modular el crecimiento de linfocitos T-reg en pacientes que padecen un cáncer en el que las células cancerosas expresan cantidades elevadas de TNFR2 (por ejemplo, cáncer de ovario) y puede presentar efectos antagonistas incluso en presencia de agonistas del TNFR2. Extraordinariamente, dichos anticuerpos antagonistas del TNFR2 son más potentes en los linfocitos T-reg de pacientes con cáncer de ovario que en los linfocitos T-reg de donantes sin cáncer.

Ejemplo 15. Desarrollo y actividad de anticuerpos antagonistas miembros de la TNFRS o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

Los anticuerpos antagonistas y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a otros miembros de la TNFRS se pueden unir a estos receptores en una conformación de dímero antiparalelo, haciendo de este modo que los sitios de unión de ligandos afines sean estéricamente inaccesibles y, por tanto, imposibilitando la activación del receptor. Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden desarrollar usando una variedad de técnicas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos antagonistas o fragmentos de unión a antígeno que se unen a otros miembros de la TNFRS que se unen a epítomos específicos dentro de proteínas miembros de la TNFRS que son homólogos en secuencia y/o estructura a aquellos epítomos dentro de TNFR2 que se unen por TNFRAB1 y TNFRAB2 como se describe en el presente documento, o que están dentro de la misma región del miembro de la TNFRS que los epítomos descritos en el presente documento con respecto a TNFR2. Usando técnicas convencionales, un experto en la técnica puede alinear la secuencia de aminoácidos de una o más proteínas miembros de la TNFRS con la del TNFR2 humano (SEQ ID NO: 7) para identificar epítomos dentro de la(s) proteína(s) miembro(s) de la TNFRS que comparten homología de secuencia con, por ejemplo, el motivo KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20), CKPCAPGTF (SEQ ID NO: 21), CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11), DSTYTQL (SEQ ID NO: 8), PECLSCGS (SEQ ID NO: 9) o RICTCRPG (SEQ ID NO: 10) dentro del TNFR2 humano (por ejemplo, secuencias de aminoácidos dentro de otras proteínas miembros de la TNFRS que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) con una o más de las secuencias mencionadas anteriormente dentro del TNFR2 humano). Los epítomos homólogos aislados de otras proteínas miembros de la TNFRS se pueden usar posteriormente para producir anticuerpos antagonistas, por ejemplo, usando técnicas de presentación *in vitro* descritas en el presente documento, tales como presentación en fagos (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 3 anterior), presentación en levaduras, presentación en ribosomas o presentación en ARN, entre otros. Por ejemplo, la alineación de las secuencias de aminoácidos de TNFR2, DR3 y TNFR1 revela que los residuos 138-150 de la secuencia de aminoácidos de DR3 (n.º de acceso a GENBANK™ AAQ88676.1) y los residuos 185-197 de la secuencia de aminoácidos de TNFR1 (n.º de acceso a GENBANK™ NP_001056) se alinean con la región de TNFR2 que contiene los motivos CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11) y KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20). Los anticuerpos antagonistas de DR3 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen aquellos que se unen a un epítomo dentro de los residuos 138-150 de la secuencia de aminoácidos de DR3. De forma similar, los anticuerpos antagonistas de TNFR1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden unir a un epítomo dentro de los residuos 185-197 de la secuencia de aminoácidos de TNFR1.

Un péptido dentro de una proteína miembro de la TNFRS que se alinea con uno o más de los epítomos de TNFR2 descritos anteriormente (tal como un péptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia) con el motivo KCRPGFGV (SEQ ID NO: 20), CKPCAPGTF (SEQ ID NO: 21), CAPLRKCR (SEQ ID NO: 11), DSTYTQL (SEQ ID NO: 8), PECLSCGS (SEQ ID NO: 9) o RICTCRPG (SEQ ID NO: 10) dentro del TNFR2 humano se puede identificar como se describe anteriormente y sintetizar posteriormente usando técnicas convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida conocidas en la técnica o descritas en el presente documento o expresar de forma recombinante usando técnicas de expresión de proteínas basadas en células conocidas en la técnica o descritas en el presente documento. A

continuación, se puede purificar el péptido, por ejemplo, usando técnicas de HPLC convencionales conocidas en la técnica o descritas en el presente documento, y posteriormente se puede inmovilizar sobre una superficie, tal como una placa de microvaloración o una resina miscible en agua. Las colecciones de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se pueden cribar a continuación para seleccionar moléculas que se unan al péptido inmovilizado usando, por ejemplo, técnicas de presentación en fagos, presentación en levaduras, presentación en ribosomas o presentación en ARN, entre otras, como se describe en el presente documento.

También se pueden producir anticuerpos antagonistas y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención que se unen a otros miembros de la TNFRS y los estabilizan en una conformación de dímero antiparalelo, por ejemplo, usando técnicas de inmunización estándar (por ejemplo, en un mamífero no humano). En particular, se puede usar polipéptidos inmunógenos que tienen una secuencia de aminoácidos que es igual o sustancialmente similar a las secuencias de aminoácidos dentro de TNFR2 que se unen por TNFRAB1 y TNFRAB2 como se describe en el presente documento, o que están dentro de la misma región del miembro de la TNFRS que los epítopos descritos en el presente documento con respecto a TNFR2 para producir anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la invención.

Los anticuerpos antagonistas miembros de la TNFRS o fragmentos de unión a antígeno de los mismos generados como se describe anteriormente se pueden unir a y estabilizar una proteína miembro de la TNFRS en una conformación de dímero antiparalelo, por ejemplo, como se muestra en las figuras 18A (DR3) y 18B (TNFR1). Dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden usar posteriormente para inhibir la señalización del miembro de la TNFRS en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una célula humana o una célula bovina). Por ejemplo, un experto en la técnica puede usar un anticuerpo antagonista miembro de la TNFRS o un fragmento de unión a antígeno del mismo para suprimir la señalización mediada por TNFR1, Fas, DCR3, DR3, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3, TRAIL-R4, DR6, EDAR, CD271, OPG, RANK, LT β R, TWEAK-R, HVEM, CD27, CD30, CD40, CD137, OX40, GITR, BCMA, TACI, BAFFR, EDAR2, TROY o RELT en una célula diana. La inhibición de la señalización mediada por miembros de la TNFRS en la población de células diana se puede medir usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como análisis de inmunotransferencia para determinar el alcance de la expresión de genes asociados con las cascadas de transducción de señales propagadas por las proteínas miembros de la TNFRS descritas anteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The General Hospital Corporation

5 <120> ANTICUERPOS ANTAGONISTAS DE LA SUPERFAMILIA DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

<130> JA91795P.EPPD1

10 <140>

<141> 13/05/2016

<150> 16797050.8

<151> 13/05/2016

15

<150> PCT/US2016/032547

<151> 13/05/2016

<150> US 62/276.073

20 <151> 07/01/2016

<150> US 62/162.449

<151> 15/05/2015

25 <160> 283

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 523

<212> ADN

ES 2 962 885 T3

<213> Murino

<400> 1

gaccaggcat cccaggggtca ccatggagtt agtttgggca gcagatccag gggccagtgg 60
5
atagacagat ggggggtgtcg ttttggctga ggagacggtg accgcggtcc ctgcgcccc 120
gacatcgaag taccagtagc tggagtaacc atcaaccctc tgcgtgcac agtaatacat 180
10 ggccgtgtcc tcagacctca gactgctcat ttgcaggtagc aggggtgttct tggcattgtc 240
tctggagatg gtgaatcgcc ccttcacact gtctggatag taggtgtaac taccaccact 300
actaatggtt gcgacccact ccagcctctt ctccggagtc tggcgaaccc aagacatgac 360
15 ataactactg aaagtgaatc cagaggctgc acaggagagt ttcagggacc ctccaggctt 420
cactaagcct cccctgact cctgcagctg cacctccgga agcctgaatt ctgcagatat 480
20 ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagaggcc cat 523

<210> 2

<211> 123

25 <212> PRT

<213> Murino

<400> 2

ES 2 962 885 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Val Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Val Asp Gly Tyr Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3

<211> 508

5 <212> ADN

<213> Murino

<400> 3

ctccgagcgg ccgccagtgt gatggatatc tgcagaattc agggggacat tgtgctgacc 60

10

cagtctccag caatcatgtc tgcattcca ggggagaagg tcaccataac ctgcagtgcc 120

agctcaagtg tatattacat gtactggttc cagcagaagc caggcacttc tccaaactc 180

ES 2 962 885 T3

tggatttata gcacatccaa cctggcttct ggagtcctg ttcgcttcag tggcagtggc 240

tctgggacct cttactctct cacaatcagc cgaatggagg ctgaagatgc tgccacttat 300

5

tactgccagc aaaggaggaa ttacccgtac acgttcggag gggggaccaa gttggaaata 360

aaacgggctg atgctccacc aactgtatcc atcttccac catccagtga gcagttacct 420

10 gaattccagc acactggcgg ccgttactag tggatccgag ctcggtacca agcttgatgc 480

atagcttgag tattctaacg cgtcacct 508

15 <210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Murino

20 <400> 4

ES 2 962 885 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Tyr Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 5

<211> 454

5 <212> ADN

<213> Murino

<400> 5

gagcggccgc cagtgtgatg gatatctgca gaattcaggg ggacattgtg ctgaccaga 60

10

ctcctgcttc cttagctgta tctctggggc agagggccac catctcatgc agggccagca 120

aaagtgtcag tacatctggc tatagttata tgcaactggta ccaacagaaa ccaggacagc 180

15 cacccaaact cctcatctat cttgcatcca acctagaatc tggggtcctt gccaggttca 240

ES 2 962 885 T3

gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaccc tcaacatcca tcctgtggag gaggaggatg 300

ctgcaaccta ttactgtcag cacagtaggg agcttcctcg gacgttcggt ggaggcacca 360

5

agctggaaat caaacgggct gatgctccac caactgtatc caccctgaa ttccagcaca 420

ctggcggccg ttactagtgg atccgagctc ggta 454

10

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Murino

15

<400> 6

ES 2 962 885 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Ala

<210> 7

<211> 461

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 962 885 T3

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

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

ES 2 962 885 T3

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
245 250 255

Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
260 265 270

Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
275 280 285

Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
290 295 300

Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
305 310 315 320

Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
325 330 335

Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
340 345 350

Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
355 360 365

Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
370 375 380

Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
385 390 395 400

Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
405 410 415

ES 2 962 885 T3

Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
420 425 430

Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
450 455 460

<210> 8

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
1 5

10

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 9

Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser
1 5

20

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

5

Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly
1 5

<210> 11

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
1 5

15

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 12

Lys Cys Ser Pro Gly
1 5

25

<210> 13

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

5

Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val
1 5 10 15

Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu
20 25 30

Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro
35 40 45

Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
50

<210> 14

<211> 17

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val
1 5 10 15

Pro

15

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser
1 5 10 15

Ser Asp

5

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 16

Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys
1 5 10 15

Ala Leu

15

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 17

ES 2 962 885 T3

Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro
1 5 10 15

Gly Phe Gly Val
20

<210> 18

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala
1 5 10 15

Lys Val Phe Cys
20

10

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 19

Lys Cys Arg Pro Gly
1 5

20

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

5

Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
1 5

<210> 21

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe
1 5

15

<210> 22

<211> 41

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 962 885 T3

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

Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro
20 25 30

His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile
35 40

<210> 23

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Murino

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

10

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Murino

<400> 24

Ser Ser Gly Gly Ser Tyr
1 5

20

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Murino

<400> 25

5

Gln	Arg	Val	Asp	Gly	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5					10				

<210> 26

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Murino

<400> 26

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Tyr
1				5					10

15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

20

<213> Murino

<400> 27

Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

25

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Murino

<400> 28

5

Gln Gln Arg Arg Asn Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 29

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Murino

<400> 29

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

15

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Murino

<400> 30

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

25

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Murino

<400> 31

5

Gln	His	Ser	Arg	Glu	Leu	Pro	Arg	Thr
1				5				

<210> 32

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

ES 2 962 885 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Glu Asn Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Gly Ala Val Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 34

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 34

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

15

<210> 35

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 35

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20				25			

15

<210> 36

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 36

15

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
		20					25			

<210> 37

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10 <400> 37

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

<210> 38

15 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 38

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

20

<210> 39

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 39

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20				25			

15

<210> 40

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 40

Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

15

<210> 41

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 41

20

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20				25			

<210> 42

<211> 27

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15 <400> 42

Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			20					25		

<210> 43

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 43

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

25

<210> 44

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 44

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

25

<210> 45

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 45

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

20

<210> 46

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 46

15

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20				25			

<210> 47

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 47

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

<210> 48

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 48

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

15 <210> 49

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 49

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

15

<210> 50

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 50

Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			20					25		

10

<210> 51

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 51

5

Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

<210> 52

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 52

Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
20 25

<210> 53

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 53

Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

20

<210> 54

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 54

Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

15

<210> 55

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 55

15

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

<210> 56

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15 <400> 56

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

<210> 57

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 57

Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

15 <210> 58

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 58

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

20

<210> 59

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 59

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

25

<210> 60

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 60

25

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

<210> 61

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 61

Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

<210> 62

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 62

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			20					25		

15 <210> 63

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 63

Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			20				25			

10

<210> 64

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 64

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

10

<210> 65

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 65

Ang Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp
20 25

<210> 66

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 66

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
20 25

<210> 67

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 67

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

25 <210> 68

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 68

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

20

<210> 69

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 69

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20				25			

15

<210> 70

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 70

20

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

<210> 71

<211> 27

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20 <400> 71

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

<210> 72

25 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 72

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
		20					25			

15

<210> 73

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 73

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

15

<210> 74

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 74

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

20

<210> 75

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 75

25

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

<210> 76

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 76

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

<210> 77

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 77

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

10 <210> 78

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 78

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

10

<210> 79

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 79

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20				25			

5

<210> 80

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 80

Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20				25			

<210> 81

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 81

Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20					25		

<210> 82

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 82

Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

10 <210> 83

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 83

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10						15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

15

<210> 84

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 84

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

15

<210> 85

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 85

5

Glu Gly Cys Ang Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Ang Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 86

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 86

Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Ang Leu Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Ang Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 87

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 87

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

20 <210> 88

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 88

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
		20					25			

15

<210> 89

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 89

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

20

<210> 90

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 90

10

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20				25			

<210> 91

<211> 27

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 91

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

<210> 92

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 92

Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

20

<210> 93

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 93

Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

15

<210> 94

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 94

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

5

<210> 95

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 95

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20					25		

<210> 96

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 96

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

<210> 97

25

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 97

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

15

<210> 98

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 98

Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

15

<210> 99

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 99

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

15

<210> 100

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 100

10

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
		20					25			

<210> 101

<211> 27

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 101

Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
 20 25

<210> 102

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 102

Ang Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ile Cys Thr Xaa Ang Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala
20 25

<210> 103

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 103

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

20

<210> 104

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 104

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp
			20					25		

20

<210> 105

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 105

Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

10

<210> 106

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 106

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp
			20					25		

10

<210> 107

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 107

Trp Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 108

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 108

Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly
20 25

20

<210> 109

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 109

Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe
			20					25		

20

<210> 110

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 110

Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

10

<210> 111

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 111

Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly
20 25

<210> 112

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 112

Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
20 25

<210> 113

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 113

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

25 <210> 114

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 114

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ala	Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly
		20					25			

15

<210> 115

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 115

Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

5

<210> 116

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 116

Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

<210> 117

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 117

Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10				15		

Ala	Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

20 <210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> Murino

25 <400> 118

Ala Asp Ala Ala Pro
1 5

<210> 119

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Thr Val Ala Ala Pro
1 5

10

<210> 120

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Murino

<400> 120

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
1 5 10

20

<210> 121

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 121

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
1 5 10

<210> 122

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Gln Pro Lys Ala Ala Pro
1 5

10

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 123

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

20

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 124

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 125

15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 126

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 126

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 127

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Murino

<400> 127

Ala Lys Thr Thr Ala Pro
1 5

10

<210> 128

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 128

Ala Ser Thr Lys Gly Pro
1 5

20

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Murino

25

<400> 129

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

<210> 130

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

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

10

<210> 131

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <400> 131

Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 132

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <400> 132

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10

<210> 133

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 133

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
1				5					10				

20

<210> 134

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 134

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg
		20				25				

10

<210> 135

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 135

Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg
20 25

<210> 136

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

 $\langle 222 \rangle (11) \dots (11)$

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

$\langle 222 \rangle$ (26)..(26)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 136

Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg
20 25

<210> 137

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 137

Val Pro Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro
20 25

<210> 138

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 138

Pro Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro
20 25

5 <210> 139

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 139

Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro
20 25

5

<210> 140

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 140

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro
			20					25		

5

<210> 141

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 141

Leu Ser Xaa Gly Ser Ang Cys Ser Ser Asp Gln Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro
20 25

<210> 142

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 142

Ser Xaa Gly Ser Ang Cys Ser Ser Asp Gln Val Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro
20 25

<210> 143

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 143

Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro
			20					25		

25 <210> 144

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 144

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro
			20					25		

15

<210> 145

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 145

Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Ang	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro
5			20				25			

<210> 146

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 146

Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5				10						15		

Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro
			20				25			

<210> 147

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 147

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro
			20					25		

<210> 148

25

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 148

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
			20					25		

25

<210> 149

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 149

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
			20				25			

25

<210> 150

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 150

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly
			20				25			

25

<210> 151

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 151

25

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
			20				25			

<210> 152

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 152

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly
			20				25			

<210> 153

25

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 153

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10				15		

Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly
			20					25		

20

<210> 154

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 154

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
			20				25			

15

<210> 155

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 155

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
5				20				25			

<210> 156

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 156

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
			20				25			

<210> 157

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 157

Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
		20					25			

<210> 158

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 158

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly
		20					25			

15

<210> 159

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 159

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

15

<210> 160

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25 <220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 160

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

15

<210> 161

<211> 27

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 161

15

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

<210> 162

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10 <220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15 <400> 162

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

<210> 163

20 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 163

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20					25		

15

<210> 164

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 164

Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp
			20					25		

10

<210> 165

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 165

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

5

<210> 166

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 166

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

<210> 167

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 167

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

<210> 168

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 168

Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp
			20				25			

10 <210> 169

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 169

Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gln Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp
20 25

5

<210> 170

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 170

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

5

<210> 171

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 171

5

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

<210> 172

<211> 27

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

25

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 172

Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

<210> 173

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 173

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20				25			

10 <210> 174

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 174

Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

5

<210> 175

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 175

ES 2 962 885 T3

Ser Xaa Gly Ser Ang Cys Ser Ser Asp Gln Val Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

<210> 176

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 176

Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

<210> 177

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 177

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

20

<210> 178

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 178

Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

15

<210> 179

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 179

Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr
			20					25		

5

<210> 180

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 180

Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Asn Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr
20 25

<210> 181

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 181

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

<210> 182

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 182

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

15

<210> 183

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 183

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

20

<210> 184

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 184

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

25

<210> 185

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 185

25

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20					25		

<210> 186

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 186

Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa
20 25

<210> 187

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 187

Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa
20 25

<210> 188

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 188

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa
20 25

<210> 189

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 189

Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

25 <210> 190

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (21)..(21)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 190

Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

20

<210> 191

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 191

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa
			20				25			

20

<210> 192

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 192

25

Val	Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20					25		

<210> 193
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

30

<400> 193

Pro Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala
20 25

<210> 194

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

10 <223> Construcción sintética

$\langle 220 \rangle$

<221> MOD_RES

15 $\langle 222 \rangle (2) \dots (2)$

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

$\langle 220 \rangle$

<221> MOD_RES

20 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

$\langle 220 \rangle$

<221> MOD_RES

25 $\langle 222 \rangle$ (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 194

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ile	Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

10 <210> 195

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 195

Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

10

<210> 196

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 196

Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ile	Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala
			20				25			

5

<210> 197

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 197

Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala
20 25

<210> 198

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 198

Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala
20 25

<210> 199

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (26)..(26)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 199

Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ile Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala
20 25

<210> 200

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 200

Val Pro Glu Xaa Leu Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala Leu
20 25

<210> 201

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

25 <222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 201

Pro	Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

15

<210> 202

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

5 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 202

Glu	Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

20

<210> 203

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 203

Xaa	Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

25

<210> 204

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

15 <221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 204

25

Leu	Ser	Xaa	Gly	Ser	Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Ang	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

<210> 205

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 205

Ser Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala Leu
20 25

<210> 206

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<400> 206

Xaa Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala Leu
20 25

<210> 207

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 207

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Cys Thr Xaa Arg Pro Gly Trp Tyr Xaa Ala Leu
20 25

<210> 208

<211> 27

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 208

Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1			5					10					15		

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20				25			

25

<210> 209

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 209

Ang	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20					25		

20

<210> 210

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (19)..(19)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (25)..(25)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 210

Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Cys	Thr	Xaa	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu
			20				25			

20

<210> 211

<211> 27

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 211

15

Xaa	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Xaa	Thr	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln
			20				25			

<210> 212

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 212

Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Xaa	Thr	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln
		20					25			

<210> 213

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 213

Arg Glu Gln Asn Arg Ile Xaa Thr Cys Arg Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln
20 25

<210> 214

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 214

Glu Gln Asn Arg Ile Xaa Thr Cys Arg Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln
20 25

20

<210> 215

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 215

Gln	Asn	Arg	Ile	Xaa	Thr	Cys	Ang	Pro	Gly	Trp	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln
		20						25		

15

<210> 216

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(4)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 216

Asn	Arg	Ile	Xaa	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln
			20					25		

15

<210> 217

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 217

Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe
			20					25		

10

<210> 218

<211> 27

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 218

5

Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe
			20					25		

<210> 219

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

25 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 219

Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
 20 25

<210> 220

5 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (17)..(17)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 220

Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Ang Leu Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Ang Lys Cys Ang Pro Gly Phe
20 25

<210> 221

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 221

Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
 20 25

<210> 222

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 222

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
20 25

<210> 223

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 223

Lys Gln Glu Gly Cys Ang Leu Xaa Ala Pro Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Ang Lys Cys Ang Pro Gly Phe
20 25

<210> 224

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 224

Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
 20 25

<210> 225

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 225

Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe
20 25

<210> 226

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 226

Trp Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly
20 25

20

<210> 227

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

10 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 227

Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

15

<210> 228

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 228

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
5			20					25		

<210> 229

<211> 27

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 229

Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

<210> 230

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 230

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

<210> 231

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 231

Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

10 <210> 232

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 232

25

Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly
20 25

<210> 233

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 233

Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly
20 25

20

<210> 234

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 234

Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly
			20					25		

15

<210> 235

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 235

Trp Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

5

<210> 236

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 236

Tyr Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 237

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 237

15

Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20					25		

<210> 238

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 238

Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20					25		

<210> 239

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

20 <222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 239

Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 240

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 240

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

20

<210> 241

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 241

Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Leu	Arg	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly	Val
			20					25		

15

<210> 242

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 242

Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

5

<210> 243

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 243

Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Arg Lys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val
20 25

<210> 244

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 244

15

Trp	Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Leu	Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala
			20					25		

<210> 245

<211> 27

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5 <400> 245

Tyr	Xaa	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

<210> 246

10 <211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

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

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 246

Xaa Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

<210> 247

<211> 27

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

15 <223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 247

Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

20

<210> 248

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

10

<400> 248

Leu	Ser	Lys	Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20					25		

15

<210> 249

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

<400> 249

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

5

<210> 250

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

20

<400> 250

Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Xaa Ala Pro Leu Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg
20 25

<210> 251

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

15

<400> 251

Gln	Glu	Gly	Cys	Arg	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Arg	Lys	Cys	Arg	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Arg
			20				25			

<210> 252

20

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es un residuo de Cys protegido con un grupo protector ACM

5

<400> 252

Glu	Gly	Cys	Ang	Leu	Xaa	Ala	Pro	Leu	Ang	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ang	Lys	Cys	Ang	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Ang
			20					25		

10

<210> 253

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 253

Ang	Glu	Gln	Asn	Ang	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Tyr	Cys	Ala
1				5					10					15	

Leu	Ser	Lys	Gln
			20

<210> 254

20

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 254

Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg
1 5 10 15

Leu Cys Ala Pro
20

5 <210> 255

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 255

Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys
1 5 10 15

Arg Pro Gly Phe
20

<210> 256

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 256

20

ES 2 962 885 T3

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

Pro Gly Thr Glu
20

<210> 257

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Murino

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Leu o lle

<400> 257

15

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Xaa
1 5

<210> 258

<211> 8

20 <212> PRT

<213> Murino

<400> 258

Val Asp Pro Glu Tyr Gly Ser Thr
1 5

25

<210> 259

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Murino

<400> 259

Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ser	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
1				5					10				

10

<210> 260

<211> 6

<212> PRT

<213> Murino

15

<400> 260

Gln	Asn	Ile	Asn	Lys	Tyr
1			5		

20

<210> 261

<211> 9

<212> PRT

<213> Murino

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Leu o Ile

<400> 261

Cys Leu Gln Tyr Val Asn Leu Xaa Thr
1 5

5

<210> 262

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Murino

<400> 262

Leu Leu Ile Arg
1

15

<210> 263

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Gly o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

5 <223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

<400> 263

Ser Ser Gly Xaa Xaa Tyr
1 5

10

<210> 264

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es Gly o Ala

25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

<400> 264

Val Asp Pro Glu Tyr Xaa Xaa Thr
1 5

5 <210> 265

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Arg, Lys o His

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Asp o Glu

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es Gly o Ala

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Asp o Glu

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

25 <400> 265

Gln	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Tyr	Xaa	Ser	Xaa	Trp	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10				

<210> 266

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es Lys, Arg o His

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Asp o Glu

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es Gly o Ala

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

<220>

30 <221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es Asp o Glu

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

<400> 266

20

Ala Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Pro Xaa Xaa Xaa Trp Gly
1 5 10

<210> 267

<211> 10

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (10)..(10)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

<400> 267

Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Tyr	Tyr	Met	Xaa
1				5					10

10

<210> 268

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

25

<400> 268

Gln	Asn	Ile	Asn	Lys	Xaa
1			5		

<210> 269

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

15

<400> 269

Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Xaa
1				5		

20

<210> 270

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

10 <400> 270

Gln Gln Arg Arg Asn Xaa Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 271

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Trp, Phe o Tyr.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es Leu o Ile

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es Asn, Gln, Ser o Thr

<400> 271

10

Cys Leu Gln Xaa Val Asn Leu Xaa Xaa
1 5

<210> 272

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Murino

<400> 272

Cys Leu Gln Tyr Val Asn Leu Leu Thr
1 5

20

<210> 273

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Murino

<400> 273

Cys Leu Gln Tyr Val Asn Leu Ile Thr
1 5

<210> 274

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Murino

<400> 274

10 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Leu
1 5

<210> 275

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Murino

<400> 275

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ile
1 5

<210> 276

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

5 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

10 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

15 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 276

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Tyr
1 5

20

<210> 277

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

10

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

20

<400> 277

Gly Xaa Thr Phe Xaa Xaa Tyr Xaa
1 5

25

<210> 278

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

20 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

25 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

30 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

5 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

10 <400> 278

Xaa	Arg	Xaa	Asp	Gly	Xaa	Ser	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Phe	Asp	Xaa
1				5				10					

<210> 279

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (1)..(1)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

5 <221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

10 <221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

15 <221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

20 <221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

25 <221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 279

30

ES 2 962 885 T3

Xaa Arg Xaa Asp Gly Ser Tyr Xaa Xaa Phe Asp Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 280

<211> 459

5 <212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 280

ES 2 962 885 T3

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

ES 2 962 885 T3

Val Ala Arg Gly Pro Ala Thr Thr Arg Ser Gln His Met Glu Pro Thr
210 215 220

Leu Gly Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Phe Phe Leu Leu Pro Lys Val
225 230 235 240

Pro Ser Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Gln Pro Asn Thr Gly Asn Ile
245 250 255

Ser Leu Pro Ile Glu Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu
260 265 270

Leu Ile Val Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Lys Lys Lys Lys
275 280 285

Pro Phe Cys Leu Gln Gly Asp Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asn
290 295 300

Lys Ala Gln Gly Ala Pro Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Thr Thr
305 310 315 320

Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Ser Ser Thr
325 330 335

Asp Lys Arg Ala Pro Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ser Pro Gly Val Glu
340 345 350

Lys Ala Ser Thr Ser Gly Glu Ala Gln Thr Gly Cys Ser Ser Ser Glu
355 360 365

Ala Ser Ser Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val
370 375 380

Asn Val Cys Ser Gly Pro Asp His Ser Ser Gln Cys Pro Ser Gln Ala
385 390 395 400

Gly Ser Thr Arg Asp Thr Asp Ala Ser Thr Pro Asn Ser Pro Lys Glu
405 410 415

ES 2 962 885 T3

Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Arg Pro Phe Gln Ser Gln Pro
 420 425 430

Gly Ala Pro Glu Thr Leu Leu Gln Gly Leu Glu Glu Lys Pro Leu Pro
 435 440 445

Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455

<210> 281

<211> 458

5 <212> PRT

<213> Bison bison

<400> 281

ES 2 962 885 T3

Met Ala Pro Thr Ala Phe Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Gln Phe
1 5 10 15

Trp Ala Ala Gly Arg Ala Val Pro Ala Gln Ala Val Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ile Pro Glu Pro Gly Ser Ser Cys Arg Gln Gln Glu Tyr Tyr Asn His
35 40 45

Lys Ile Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Val Gln
50 55 60

Ser Leu Cys Asn Thr Thr Leu Asp Thr Ile Cys Ala Ser Cys Glu Ser
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Leu Val Thr Ala Cys Phe Ser Cys
85 90 95

Asn Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Thr
100 105 110

Lys Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Lys Pro Gly Trp Tyr Cys Thr Leu
115 120 125

Gly Arg Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Val Ala Leu Arg Lys Cys Gly
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Lys Pro Gly Thr Ala Thr Thr Asn Val Ile
145 150 155 160

Cys Ala Pro Cys Gly Pro Gly Thr Phe Ser Asp Thr Thr Ser Tyr Thr
165 170 175

Asp Thr Cys Lys Pro His Arg Asn Cys Ser Ser Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Thr Ala Ser Thr Asp Ala Val Cys Thr Ser Val Leu Pro Thr Arg Lys
195 200 205

ES 2 962 885 T3

Val Ala Ang Gly Pro Ala Thr Thr Ang Ser Gln His Met Glu Pro Thr
 210 215 220
 Leu Gly Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Phe Phe Leu Leu Pro Lys Val
 225 230 235 240
 Pro Ser Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Gln Pro Asn Ala Gly Asn Ile
 245 250 255
 Ser Leu Pro Ile Glu Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu
 260 265 270
 Leu Ile Val Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Lys Lys Lys Lys
 275 280 285
 Pro Phe Cys Leu Gln Gly Asp Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asn
 290 295 300
 Lys Ala Gln Gly Ala Pro Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Thr Thr
 305 310 315 320
 Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Thr Ser Ser Thr
 325 330 335
 Asp Lys Ang Ala Pro Thr Ang Ser Gln Leu Gln Ser Pro Gly Val Glu
 340 345 350
 Ala Asn Thr Ser Gly Glu Ala Gln Thr Gly Cys Ser Ser Ser Glu Ala
 355 360 365
 Ser Ser Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn
 370 375 380
 Val Cys Ser Gly Pro Asp His Ser Ser Gln Cys Pro Ser Gln Ala Gly
 385 390 395 400
 Ser Thr Ang Asp Thr Asp Ala Ser Thr Pro Asn Ser Pro Lys Glu Glu
 405 410 415

ES 2 962 885 T3

Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Arg Pro Phe Gln Ser Gln Pro Gly
 420 425 430

Ala Pro Glu Thr Leu Leu Gln Gly Leu Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu
 435 440 445

Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
 450 455

<210> 282

<211> 474

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 282

ES 2 962 885 T3

Met Ala Pro Ala Ala Leu Trp Val Ala Leu Val Phe Glu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Trp Ala Thr Gly His Thr Val Pro Ala Gln Val Val Leu Thr Pro Tyr
20 25 30

Lys Pro Glu Pro Gly Tyr Glu Cys Gln Ile Ser Gln Glu Tyr Tyr Asp
35 40 45

Arg Lys Ala Gln Met Cys Cys Ala Lys Cys Pro Pro Gly Gln Tyr Val
50 55 60

Lys His Phe Cys Asn Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Ala Asp Cys Glu
65 70 75 80

Ala Ser Met Tyr Thr Gln Val Trp Asn Gln Phe Arg Thr Cys Leu Ser
85 90 95

Cys Ser Ser Ser Cys Thr Thr Asp Gln Val Glu Ile Arg Ala Cys Thr
100 105 110

Lys Gln Gln Asn Arg Val Cys Ala Cys Glu Ala Gly Arg Tyr Cys Ala
115 120 125

Leu Lys Thr His Ser Gly Ser Cys Arg Gln Cys Met Arg Leu Ser Lys
130 135 140

Cys Gly Pro Gly Phe Gly Val Ala Ser Ser Arg Ala Pro Asn Gly Asn
145 150 155 160

Val Leu Cys Lys Ala Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp Thr Thr Ser
165 170 175

Ser Thr Asp Val Cys Arg Pro His Arg Ile Cys Ser Ile Leu Ala Ile
180 185 190

Pro Gly Asn Ala Ser Thr Asp Ala Val Cys Ala Pro Glu Ser Pro Thr
195 200 205

ES 2 962 885 T3

Leu Ser Ala Ile Pro Arg Thr Leu Tyr Val Ser Gln Pro Glu Pro Thr
210 215 220

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

Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Thr Pro Ile Ile Glu Gln Ser Thr Lys
245 250 255

Gly Gly Ile Ser Leu Pro Ile Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ser Leu
260 265 270

Gly Leu Leu Met Leu Gly Leu Val Asn Cys Ile Ile Leu Val Gln Arg
275 280 285

Lys Lys Lys Pro Ser Cys Leu Gln Arg Asp Ala Lys Val Pro His Val
290 295 300

Pro Asp Glu Lys Ser Gln Asp Ala Val Gly Leu Glu Gln Gln His Leu
305 310 315 320

Leu Thr Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala
325 330 335

Ser Ala Gly Asp Arg Arg Ala Pro Pro Gly Gly His Pro Gln Ala Arg
340 345 350

Val Met Ala Glu Ala Gln Gly Phe Gln Glu Ala Arg Ala Ser Ser Arg
355 360 365

Ile Ser Asp Ser Ser His Gly Ser His Gly Thr His Val Asn Val Thr
370 375 380

Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser
385 390 395 400

Ser Gln Ala Ser Ala Thr Val Gly Asp Pro Asp Ala Lys Pro Ser Ala
405 410 415

Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Gln Glu Glu Cys Pro Ser
420 425 430

Gln Ser Pro Cys Glu Thr Thr Glu Thr Leu Gln Ser His Glu Lys Pro
435 440 445

Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Met Gly Met Lys Pro Ser Gln Ala Gly
450 455 460

Trp Phe Asp Gln Ile Ala Val Lys Val Ala
465 470

<210> 283

<211> 474

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 283

ES 2 962 885 T3

Met Ala Pro Ala Ala Leu Trp Val Ala Leu Val Val Glu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Trp Ala Thr Gly His Thr Val Pro Ala Lys Val Val Leu Thr Pro Tyr
20 25 30

Lys Pro Glu Pro Gly Asn Gln Cys Gln Ile Ser Gln Glu Tyr Tyr Asp
35 40 45

Lys Lys Ala Gln Met Cys Cys Ala Lys Cys Pro Pro Gly Gln Tyr Ala
50 55 60

Lys His Phe Cys Asn Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Ala Asp Cys Ala
65 70 75 80

Ala Gly Met Phe Thr Gln Val Trp Asn His Leu His Thr Cys Leu Ser
85 90 95

Cys Ser Ser Ser Cys Ser Asp Asp Gln Val Glu Thr His Asn Cys Thr
100 105 110

Lys Lys Gln Asn Arg Val Cys Ala Cys Asn Ala Asp Ser Tyr Cys Ala
115 120 125

Leu Lys Leu His Ser Gly Asn Cys Arg Gln Cys Met Lys Leu Ser Lys
130 135 140

Cys Gly Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Ser Arg Thr Ser Asn Gly Asn
145 150 155 160

Val Ile Cys Ser Ala Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asp Thr Thr Ser
165 170 175

Ser Thr Asp Val Cys Arg Pro His Arg Ile Cys Ser Ile Leu Ala Ile
180 185 190

Pro Gly Asn Ala Ser Thr Asp Ala Val Cys Ala Ser Glu Ser Pro Thr
195 200 205

ES 2 962 885 T3

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

Arg Ser Gln Pro Met Asp Gln Glu Pro Gly Pro Ser Gln Thr Pro His
225 230 235 240

Ile Pro Val Ser Leu Gly Ser Thr Pro Ile Ile Glu Pro Ser Ile Thr
245 250 255

Gly Gly Ile Ser Leu Pro Ile Gly Leu Ile Val Gly Leu Thr Thr Leu
260 265 270

Gly Leu Leu Met Leu Gly Leu Ala Asn Cys Phe Ile Leu Val Gln Arg
275 280 285

Lys Lys Lys Pro Ser Cys Leu Gln Arg Glu Thr Met Val Pro His Leu
290 295 300

Pro Asp Asp Lys Ser Gln Asp Ala Ile Gly Leu Glu Gln Gln His Leu
305 310 315 320

Leu Thr Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala
325 330 335

Ser Ala Gly Asp Arg Arg Ala Pro Pro Gly Gly His Pro Gln Ala Arg
340 345 350

Val Thr Ala Glu Ala Gln Gly Ser Gln Glu Ala Cys Ala Gly Ser Arg
355 360 365

Ser Ser Asp Ser Ser His Gly Ser His Gly Thr His Val Asn Val Thr
370 375 380

Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser
385 390 395 400

Ser Gln Ala Ser Thr Thr Val Gly Asp Pro Asp Ala Asn Pro Ser Gly
405 410 415

ES 2 962 885 T3

Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Gln Glu Glu Cys Pro Ser
420 425 430

Gln Ser Gln Trp Glu Thr Thr Glu Thr Leu Gln Asn His Asp Lys Pro
435 440 445

Phe Pro Leu Gly Val Pro Asp Val Gly Met Lys Pro Asn Gln Pro Gly
450 455 460

Trp Tyr Asp Gln Ile Ala Val Lys Val Pro
465 470

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal antagonista humanizado o quimérico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se puede unir específicamente a TNFR2 humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad (CDR):

- (a) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23);
- (b) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24);
- (c) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25);
- (d) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26)
- (e) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27); y
- (f) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28);
- (a) en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende las CDR siguientes:
- (g) una CDR-H1 que tiene la secuencia de aminoácidos GYTFDITYL (SEQ ID NO: 274);
- (h) una CDR-H2 que tiene la secuencia de aminoácidos VDPEYGST (SEQ ID NO: 258);
- (i) una CDR-H3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259);
- (j) una CDR-L1 que tiene la secuencia de aminoácidos QNINKY (SEQ ID NO: 260)
- (k) una CDR-L2 que tiene la secuencia de aminoácidos YTS; y
- (l) una CDR-L3 que tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLIT (SEQ ID NO: 273).

2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que:

- (a) la CDR-H1 tiene la secuencia de aminoácidos GFTFSSY (SEQ ID NO: 23);
- (b) la CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos SSGGSY (SEQ ID NO: 24);
- (c) la CDR-H3 tiene la secuencia de aminoácidos QRVDGYSSYWYFDV (SEQ ID NO: 25);
- (d) la CDR-L1 tiene la secuencia de aminoácidos SASSSVYYMY (SEQ ID NO: 26)
- (e) la CDR-L2 tiene la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEQ ID NO: 27); y
- (f) la CDR-L3 tiene la secuencia de aminoácidos QRRNYPYT (SEQ ID NO: 28).

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que:

- (a) la CDR-H1 tiene la secuencia de aminoácidos GYTFDITYL (SEQ ID NO: 274);
- (b) la CDR-H2 tiene la secuencia de aminoácidos VDPEYGST (SEQ ID NO: 258);
- (c) la CDR-H3 tiene la secuencia de aminoácidos ARDDGSYSPFDYWG (SEQ ID NO: 259);
- (d) la CDR-L1 tiene la secuencia de aminoácidos QNINKY (SEQ ID NO: 260)
- (e) la CDR-L2 tiene la secuencia de aminoácidos YTS; y
- (f) la CDR-L3 tiene la secuencia de aminoácidos CLQYVNLIT (SEQ ID NO: 273).

4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo:

- (a) se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo primatizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo multiespecífico o fragmento de unión a antígeno del mismo, un dominio de inmunoglobulina variable dual, un anticuerpo monovalente o

fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula Fv monocatenaria (scFv), un diacuerpo, un triacuerpo, un andamio proteico similar a un anticuerpo, un fragmento Fv, un fragmento Fab, una molécula F(ab')₂ y un scFv en tándem (taFv), opcionalmente en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es una molécula F(ab')₂;

(b) tiene un isotipo seleccionado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgM, IgD e IgE;

(c) se conjuga con un agente terapéutico, preferentemente en el que dicho agente terapéutico es un agente citotóxico; y/o

(d) es un polipéptido monocatenario.

5. Una construcción que comprende un primer dominio polipeptídico y un segundo dominio polipeptídico, en el que dicho primer dominio polipeptídico y dicho segundo dominio polipeptídico comprenden cada uno independientemente un polipéptido monocatenario de la reivindicación 4 (d) y en el que dicha construcción carece de un dominio Fc murino,

opcionalmente en el que dicho primer dominio polipeptídico y dicho segundo dominio polipeptídico se unen por un conector covalente, preferentemente en el que dicho conector covalente comprende un enlace amida o un enlace disulfuro.

6. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la construcción de la reivindicación 5.

7. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6, opcionalmente en el que:

(a) dicho vector es un vector de expresión, opcionalmente en el que dicho vector de expresión es un vector de expresión eucariótico; o

(b) dicho vector es un vector vírico, opcionalmente en el que dicho vector vírico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus (Ad), retrovirus, poxvirus, virus adenoasociado, baculovirus, virus del herpes simple y un virus vaccinia, opcionalmente en el que dicho adenovirus es un adenovirus de serotipo 5, 26, 35 o 48, dicho retrovirus es un γ-retrovirus o un lentivirus, o dicho virus vaccinia es un virus vaccinia modificado de Ankara (MVA).

8. Una célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 7, opcionalmente en la que:

(a) dicha célula huésped es una célula procariota; o

(b) dicha célula huésped es una célula eucariota, preferentemente en la que dicha célula eucariota es una célula de mamífero, preferentemente en la que dicha célula de mamífero es una célula CHO.

9. Un procedimiento para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la construcción de la reivindicación 5, comprendiendo dicho procedimiento expresar un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo o construcción en una célula huésped y recuperar el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo o construcción del medio de la célula huésped.

10. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la construcción de la reivindicación 5, el polinucleótido de la reivindicación 6, el vector de la reivindicación 7 o la célula huésped de la reivindicación 8 para su uso para:

(i) tratar un trastorno de proliferación celular en un ser humano;

opcionalmente en el que:

(a) dicho trastorno de proliferación celular es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de huesos, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama, cáncer cardíaco, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad bucal, cáncer ocular, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer testicular y cáncer de garganta; o

(b) dicho trastorno de proliferación celular es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (MLC), carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado con SIDA, linfoma primario del SNC, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoideo/rabdoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer extrahepático, familia del sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, tumores

embrionarios del sistema nervioso central, tumores de células germinales del sistema nervioso, craneofaringioma, ependimoma, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma primario, cordoma, neoplasias mieloproliferativas crónicas, cáncer de colon, cáncer de vías biliares extrahepático, carcinoma ductal in situ (CDIS), cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de trompas de Falopio, histiocitoma fibroso de hueso, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales testiculares, enfermedad trofoblástica gestacional, glioma, glioma de tronco encefálico infantil, leucemia de células pilosas, cáncer hepatocelular, histiocitosis de células de Langerhans, linfoma hodgkiniano, cáncer de hipofaringe, tumores de células de islotes, tumores neuroendocrinos de páncreas, tumor de Wilms y otros tumores renales infantiles, histiocitosis de células de Langerhans, carcinoma pulmonar microcítico, linfoma cutáneo de linfocitos T, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso de cuello metastásico, carcinoma de línea media, síndromes de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndromes mielodisplásicos, cáncer de cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no hodgkiniano (LNH), carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), cáncer de ovario epitelial, cáncer de ovario de células germinales, cáncer de ovario de bajo potencial maligno, tumores neuroendocrinos de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer de senos paranasales y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumor pituitario, blastoma pleuropulmonar, cáncer peritoneal primario, cáncer de recto, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma de Kaposi, rhabdomyosarcoma, síndrome de Sézary, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y del uréter, cáncer uretral, cáncer de endometrio uterino, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva y macroglobulinemia de Waldenström;

(II) inhibir una respuesta inmunitaria mediada por un linfocito T reguladora en un ser humano;

o

(III) tratar una enfermedad infecciosa en un ser humano;

opcionalmente en la que dicha enfermedad infecciosa es causada por uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un virus, una bacteria, un hongo o un parásito;

opcionalmente en la que:

(a) dicha enfermedad infecciosa es causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla, virus Kadam, virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur, virus Langat, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus Powassan, virus Royal Farm, virus Karshi, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus Neudoerfl, virus Sofjin, virus de la encefalomiелitis ovina, virus Negishi, virus Meaban, virus Saumarez Reef, virus Tyuleniy, virus Aroa, virus del dengue, virus Kedougou, virus Cacipacore, virus Koutango, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis del Valle de Murray, virus de la encefalitis de San Luis, virus Usutu, virus del Nilo Occidental, virus de Yaundé, virus Kokobera, virus Bagaza, virus Ilhéus, virus de la meningoencefalomiелitis del pavo de Israel, virus Ntaya, virus Tembusu, virus Zika, virus Banzí, virus Bouboui, virus Edge Hill, virus Jugra, virus Saboya, virus Sepik, virus Uganda 5, virus Wesselsbron, virus de la fiebre amarilla, virus del murciélago de Entebbe, virus Yokose, virus Apoi, virus Cowbone Ridge, virus Jutiapa, virus Modoc, virus Sal Vieja, virus San Perlita, virus del murciélago de Bukalasa, virus de Carey Island, virus del murciélago de Dakar, virus de la leucoencefalitis myotis de Montana, virus del murciélago de Phnom Penh, virus del Río Bravo, virus del murciélago de Tamana, virus del agente de fusión celular, virus Ippy, virus Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), virus Mobala, virus Mopeia, virus Amapari, virus Flexal, virus Guanarito, virus Junin, virus Latino, virus Machupo, virus Oliveros, virus Paraná, virus Pichinde, virus Pirital, virus Sabiá, virus Tacaribe, virus Tamiami, virus Whitewater Arroyo, virus Chapare, virus Lujo, virus Hantaan, virus Sin Nombre, virus Dugbe, virus Bunyamwera, virus de la fiebre del Valle del Rift, virus de La Crosse, virus de la encefalitis de California, virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (FHCC), virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina occidental (EEO), virus Sindbis, virus de la rubéola, virus del bosque de Semliki, virus del río Ross, virus del bosque de Barmah, virus O'nyong'nyong y el virus chikungunya, virus de la viruela, virus de la viruela del simio, virus vaccinia, virus del herpes simple, virus del herpes humano, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la varicela-zóster, virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV), virus de la gripe, virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus respiratorio sincitial humano (RSV), virus de la enfermedad de Newcastle, hendravirus, nipahvirus, virus del sarampión, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus Sendai, virus paragripal humano (por ejemplo, 1, 2, 3 y 4), rinovirus, virus de las paperas, poliovirus, enterovirus humano (A, B, C y D), virus de la hepatitis A, virus coxsackie, virus de la hepatitis B, virus del papiloma humano, virus adenoasociados, astrovirus, virus JC, virus BK, virus SV40, virus Norwalk, rotavirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus linfotrópico T humano tipos I y II;

(b) dicha enfermedad infecciosa es causada por una bacteria que pertenece a un género seleccionado del grupo que consiste en *Salmonella*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Neisseria*, *Actinobacter*,

Moraxella, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella, Serratia, Enterobacter, Proteus, Salmonella, Shigella, Yersinia, Haemophilus, Bordatella, Legionella, Pasturella, Francisella, Brucella, Bartonella, Clostridium, Vibrio, Campylobacter y Staphylococcus;

5 (c) dicha enfermedad infecciosa es causada por un hongo seleccionado del grupo que consiste en *Aspergillus, Candida, Malassezia, Trichosporon, Fusarium, Acremonium, Rhizopus, Mucor, Pneumocystis y Absidia*; o

(d) dicha enfermedad infecciosa es causada por un parásito seleccionado del grupo que consiste en *Entamoeba hystolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium muris, Trypanosomatida gambiense, Trypanosomatida rhodesiense, Trypanosomatida crusi, Leishmania mexicana, Leishmania braziliensis, Leishmania tropica, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium falciparum, Trichomonas vaginalis* e *Histomonas meleagridis*. Los parásitos helmínticos ejemplares incluyen *Trichuris trichiura, Ascaris lumbricoides, Enterobius vermicularis, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Strongyloides stercoralis, Wuchereria bancrofti y Dracunculus medinensis, Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Fasciola hepatica, Fasciola gigantica, Heterophyes, Paragonimus westermani, Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis nana y Echinococcus granulosus*.

10

15

11. Un kit que comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la construcción de la reivindicación 5, el polinucleótido de la reivindicación 6, el vector de la reivindicación 7 o la célula huésped de la reivindicación 8;

20

opcionalmente en el que dicho kit comprende además:

25 (a) instrucciones para transfectar dicho vector en una célula huésped;

(b) instrucciones para expresar dicho anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo o construcción en dicha célula huésped;

30 (c) un reactivo que se puede usar para expresar el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno del mismo, polipéptido monocatenario o construcción en dicha célula huésped;

(d) instrucciones para administrar dicho agente a un paciente humano; o

35 (e) instrucciones para preparar o usar dicho agente.

FIG. 1A. Secuencias de ADN y de aminoácidos de la cadena pesada de TNFRAB1

Cadena pesada de TNFRAB1

Secuencia de ADN

GACCAGGCATCCCAGGGTCACCATGGAGTTAGTTTGGGCAGCAGATCCAGGGGCCAGTGGATAGA
CAGATGGGGGTGTGTTTTGGCTGAGSAGAAGGTGACCGCGGTCCCTGCGCCCCAGACATCGAAG
TACCAGTAGCTGGAGTAACCATCAACCCCTCTGTGTGCACAGTAATACATGGCCGTGTCCTCAGACC
TCAGACTGCTCATTTGCAGGTACAGGGTGTCTTGGCATTGTCTCTGGAGATGGTGAATCGCCCTT
CACACTGTCTGGATAGTAGGTGTAACCTACCACCACTACTAATGGTTGCGACCCACTCCAGCCTCTC
TCCGGAGTCTGGCGAACCCAAGACATGACATAACTACTGAAAGTGAATCCAGAGGCTGCACAGGAG
AGTTTCAGGGACCCCTCCAGGCTTCACTAAGCCTCCCCCTGACTCCTGCAGCTGCACCTCCGGAAGC
CTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCG-AGCATGCATCTAGAGGCCCAT

Secuencia de aminoácidos

EVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYVMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRF
TISRDNAKNTLYLOMSSLRSEDAMYYCARQRVDGYSSYWYFDVWGAGTAVTVSS

FIG. 1B. Secuencias de ADN y de aminoácidos de la cadena ligera de TNFRAB1

Cadena ligera de TNFRAB1 n.º 1

Secuencia de ADN

CTCCGAGCGGCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGGGGGACATTGTGCTGACCCAGTCT
CCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAT
ATTACATGTAAGTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTATAGCACATCCAAC
CTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTGGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCA
GCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGGAATTACCCGTACACGTT
CGGAGGGGGGACCAAGTTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTCCACCAACTGTATCCATCTTCCCACC
ATCCAGTGAGCAGTTACCTGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTA
CCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGGCTCACCT 7/16

Secuencia de aminoácidos

DIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVYYMYWFQOKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRFSGSGSGTSY
SLTISRMEAEDAATYYCQQRNYPYTFGGGTKLEIKRA

FIG. 2A. Epítopos dentro de TNFR2 unidos por TNFRAB1

10	20	30	40	50
MAFVAVWAAL	AVGLELWAAZ	HALPAQVAF	RYAPEPGSTC	RLREYYDQTA
60	70	80	90	100
QMCCSKCSPG	QHAKVFCTYT	SDTVCLSCED	STYTQLNWW	PECLSGGSEC
110	120	130	140	150
SSDQVETQAC	TREQNRICTC	RPGWYCALSK	QEGCRLCAPL	PNQPRSPSLA
160	170	180	190	200
REGTETSEVV	QKQEPGIES	NTTSSTDICK	PHQICNVVAI	PGNASMLAVC
210	220	230	240	250
TSTSFTRSMH	PGAVHLPQPV	STRSQHTQPT	PEFSTAPSTS	FLLPMGPSPP
260	270	280	290	300
AECSTGDFAL	EVGLIVGVTA	LGLLIIGVYN	GVINTQVKKK	PLCLQREAKV
310	320	330	340	350
PHLPADKARG	TQGPEQQHLL	ITAPSSSSSS	LESSASALDR	PAPTRNQPQA
360	370	380	390	400
PGVEASGAGE	ARASTGSSDS	SPGGRTQVNV	VTCLVNVCS	SDHSSQCSBQ
410	420	430	440	450
ASSTMGDTDS	SPSESPLKLEQ	VPESKEECAP	RSQLETFETL	LGSTEEKPLP
460				
LGVPDAGMKP	S			

FIG. 2B. Epítomos dentro de TNFR2 unidos por TNFRAB2

10	20	30	40	50
MAPVAVWAAL	AVGLELWAAA	HALPAQVAPT	PYAPFPGSTC	PLREYVLQTA
60	70	80	90	100
QMCCSKCSPG	QHAKVFCTKT	SLFVODSCET	NTVTSQWNWV	PLQLSCQSRC
110	120	130	140	150
SSDQVETQAC	TREQNELCTN	PRGMYCALS	QEGCRLKPRD	PGFGVA
160	170	180	190	200
RFGTETSDVY	CKPCAPGTFS	NTTSSTDICK	PHQICNVVAI	PGNASMLAVC
210	220	230	240	250
TSTSPTRSMA	PCAVHLFQEV	STRSQHTQPT	PEPSTAPSTS	FLIPMGPSPP
260	270	280	290	300
AEGSTGDFAL	PVGLIVGVTA	LGLLIIGVYN	CVIMTQVKKK	PLCLQREAKV
310	320	330	340	350
PHLPADKARG	TQGPEQQHLL	ITAPSSSSSS	LESSASALDR	RAPTRNQBPQA
360	370	380	390	400
PGVEASGAGE	ARASTGSSDS	SEGGHGTQUN	VTCIVNVCSS	SDHSSQCSSQ
410	420	430	440	450
ASSTNGLTDS	SPSESPKDEQ	VEFSKEECAE	RSQLETPETL	LGSTEEKPLF
460				
LGVPDAGMEP	S			

FIG. 3A. Mapeo de epítomos de TNFRAB1

SEQ ID NO.	Secuencia peptidica	Grupo estructural	Datos de luminiscencia sin procesar
134	SRCSSDQVETQGGSGGTREQNR ICT2R	CYS.S	177
135	RCSSDQVETCAGGSGGTREQNR ICT2R	CYS.S	125
136	CSSDQVETQA2GGSGGTREQNR ICT2R	CYS.S	179
137	VPE2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	318
138	PE2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	291
139	E2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	323
140	2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	262
141	LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	261
142	S2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	247
143	2GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	228
144	GSR CGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	166
145	SRCSSDQVETQGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	157
146	RCSSDQVETCAGGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	130
147	CSSDQVETQA2GGSGGREQNR ICT2RP	CYS.S	250
148	VPE2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RPG	CYS.S	225
149	PE2LS2GSR CGGSGGREQNR ICT2RPG	CYS.S	229

FIG. 3A (continuación)

150	E2LS2GSRCS5GGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	152
151	2LS2G3RC35GGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	214
152	LS2G5RC5SDQG6SGGGEONRICT2RPG	CYS.S	244
153	S2GSRCS5SDQVGGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	235
154	2GSRCS5DQVEGGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	221
155	GSRCS5DQVETGGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	202
156	SRCS5DQVETQGGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	222
157	RCSSDQVETQAGGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	183
158	CS5DQVETQA2GGSGGGEONRICT2RPG	CYS.S	248
159	VPE2LS2G5RCGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	577
160	PE2LS2G5RCGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	543
161	E7LS2G5RCSSGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	482
162	2LS2G5RCSSDGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	345
163	LS2G5RCSSDQG6SGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	291
164	S2G5RCSSDQVGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	364
165	2G5RCSSDQVEGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	493
166	GSRCS5DQVETGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	466
167	SRCS5DQVETQGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	402
168	RCSSDQVETQAGGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	507
169	CS5DQVETQA2GGSGGGEONRICT2RPGW	CYS.S	493

FIG. 3A (continuación)

170	VPE2LS2G5RCGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	853
171	PE2LS2G5RCGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	928
172	E2LS2G5RCSSDGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	389
173	2LS2G5RCSSDGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	878
174	LS2G5RCSSDQGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	822
175	S2G5RCSSDQVGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	666
176	2G5RCSSDQVEGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	588
177	G5RCSSDQVETGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	587
178	SRCSSDQVETQGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	482
179	RCSSDQVETQAGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	247
180	CSSDQVETQA2GGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	487
181	VPE2LS2G5RCGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	478
182	PE2LS2G5RCGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	585
183	E2LS2G5RCSSGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	478
184	2LS2G5RCSSDGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	436
185	LS2G5RCSSDQGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	546
186	S2G5RCSSDQVGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	465
187	2G5RCSSDQVEGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	614
188	G5RCSSDQVETGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	594
189	SRCSSDQVETQGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	568
190	RCSSDQVETQAGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	543

FIG. 3A (continuación)

191	CS3DQVETQA2GG5GGGICT2RPGWY2	CYS.S	597
192	VPE2LS2GSRCSGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	540
193	PE2LS2GSRCSGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	542
194	E2LS2GSRCSGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	454
195	2GSRCS5DQVEGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	402
196	GSRCS5DQVETGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	403
197	5RCS5DQVETGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	388
198	RC55DQVETQAGG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	372
199	C55DQVETQA2GG5GGICT2RPGWY2A	CYS.S	454
200	VPE2LS2GSRCSGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	483
201	PE2LS2GSRCSGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	697
202	E2LS2GSRCSGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	605
203	2LS2GSRCS5DGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	603
204	LS2GSRCS5DGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	510
205	52GSRCS5DQVGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	538
206	2GSRCS5DQVEGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	480
207	GSRCS5DQVETGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	464
208	5RCS5DQVETGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	391
209	RC55DQVETQAGG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	319
210	C55DQVETQA2GG5GGCT2RPGWY2AL	CYS.S	265

FIG. 3A (continuación)

211	2TREQNRI2TCGGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	101
212	TREQNRI2TCRGGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	188
213	REQNRI2TCRPGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	228
214	EQNRI2TCRPGSGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	268
215	QNRI2TCRPGWGGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	240
216	NRI2TCRPGWYGGSGGRPGWYCALSKQ	CYS.S	426
217	WY2ALSKQEGCGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	327
218	Y2ALSKQEGCRGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	308
219	2ALSKQEGCRLGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	439
220	ALSKQEGCRL2GGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	560
221	L5KQEGCRL2AGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	529
222	SKQEGCRL2APGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	507
223	KQEGCRL2APLGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	528
224	QEGCRL2APLRGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	570
225	EGCRL2APLRKGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	604
226	WY2ALSKQEGCGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	534
227	Y2ALSKQEGCRGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	553
228	2ALSKQEGCRLGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	418
229	ALSKQEGCRL2GGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	321
230	L5KQEGCRL2AGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	253
231	SKQEGCRL2APGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	220
232	KQEGCRL2APLGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	242

FIG. 3A (continuación)

233	QEGCRLZAPLRGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	340
234	EGCRLZAPLRKGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	312
235	WY2ALSKQEGCGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	341
236	YZALSKQEGCRGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	321
237	ZALSKQEGCRLGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	414
238	ALSKQEGCRLZGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	446
239	LSKQEGCRLZAGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	434
240	SKQEGCRLZAPGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	369
241	KQEGCRLZAPLGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	457
242	QEGCRLZAPLRGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	558
243	EGCRLZAPLRKGGSGGGLRKRCPGFGV	CYS.S	450
244	WY2ALSKQEGCGGSGGGLRKRCPGFGVA	CYS.S	336
245	YZALSKQEGCRGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	463
246	ZALSKQEGCRLGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	443
247	ALSKQEGCRLZGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	459
248	LSKQEGCRLZAGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	474
249	SKQEGCRLZAPGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	430
250	KQEGCRLZAPLGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	430
251	QEGCRLZAPLRGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	426
252	EGCRLZAPLRKGGSGGGRKRCPGFGVAR	CYS.S	358

Fig. 3B. Mapeo de epítomos de TNFRAB2

SEQ ID NO.	Secuencia peptídica	Grupo estructural	Datos de luminiscencia sin procesar
34	PE2LS2GSRCSSGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	928
35	2LS2GSRCSSDGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	878
36	VPE2LS2GSRCGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	853
37	LS2GSRCSSDQGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	822
38	PE2LS2GSRCSSGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	697
39	S2GSRCSSDQVGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	666
40	2GSRCSSDQVEGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	614
41	E2LS2GSRCSSGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	605
42	EGCRL2APLRKGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	604
43	2LS2GSRCSSDGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	603
44	CSSDQVETOA2GGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	597
45	GSRCSSDQVETGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	594
46	2GSRCSSDQVEGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	588
47	GSRCSSDQVETGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	587
48	PE2LS2GSRCSSGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	585
49	VPE2LS2GSRCGGSGGQNRRICT2RPGW	CYS.S	577
50	QEGCRL2APLRGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	570
51	SRCSSDQVETQGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	568

FIG. 3B (continuación)

52	ALSKQEGCRL2GGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	560
53	QEGCRL2APLRGGSGGPLRKCRPGFV	CYS.S	558
54	Y2ALSKQEGCRGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	553
55	LS2GSRCSDDQGGSGGRIC2RPGWY2	CYS.S	546
56	PE2LS2GSRCSGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	543
57	RCSSDQVETQAGGSGGRCT2RPGWY2	CYS.S	543
58	PE2LS2GSRCSGGSGGIC2RPGWY2A	CYS.S	542
59	VPE2LS2GSRCSGGSGGIC2RPGWY2A	CYS.S	540
60	S2GSRCSDDQVGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	536
61	WY2ALSKQEGCGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	534
62	LSKQEGCRL2AGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	529
63	KQEGCRL2APLRGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	528
64	LS2GSRCSDDQGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	510
65	RCSSDQVETQAGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	507
66	SKQEGCRL2APGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	507
67	2GSRCSDDQVEGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	493
68	CSSDQVETQA2GGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	493

FIG. 3B (continuación)

69	CSSDQVETQA2GGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	487
70	VPE2LS2G5RCGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	483
71	E2LS2G5RCSSGGSGGNRICT2RPGW	CYS.S	482
72	SRCSSDQVETQGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	482
73	2G5RCSSDQVEGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	480
74	VPE2LS2G5RCGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	478
75	E2LS2G5RCSSGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	478
76	LSKQEGCRL2AGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	474
77	GSRCSSDQVETGGSGGNRICT2RPGW	CYS.S	466
78	S2G5RCSSDQVGGSGGRICT2RPGWY2	CYS.S	465
79	G5RCSSDQVETGGSGGCT2RPGWY2AL	CYS.S	464
80	Y2ALSKQEGCRGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	463
81	KQEGCRL2APLGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	457
82	ALSKQEGCRL2GGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	455
83	E2LS2G5RCSSGGSGGICT2RPGWY2A	CYS.S	454
84	CSSDQVETQA2GGSGGICT2RPGWY2A	CYS.S	454
85	EGCRL2APLRKGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	450
86	ALSKQEGCRL2GGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	446
87	2ALSKQEGCRLGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	443
88	2ALSKQEGCRLGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	439

FIG. 3B (continuación)

89	2LS2GSRCSDDGGSGGRIC2RPGWY2	CYS.S	438
90	LSEQEGCRL2AGGSGGGLRRCRPGFGV	CYS.S	434
91	SKQEGCRL2APGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	439
92	KQEGCRL2APLGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	439
93	QEGCRL2APLRGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	426
94	2ALSKQEGCRLGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	418
95	2ALSKQEGCRLGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	414
96	GSRCSDDQVETGGSGGICT2RPGWY2A	CYS.S	403
97	SRCSDDQVETQGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	402
98	2GSRCSDDQVEGGSGGICT2APGWY2A	CYS.S	402
99	E2LS2GSRCSDDGGSGGQNRIC2RPGWY	CYS.S	369
100	SRCSDDQVETQGGSGGICT2RPGWY2A	CYS.S	388
101	Y2ALSKQEGCRGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	381
102	RCSSDDQVETQAGGSGGICT2RPGWY2A	CYS.S	372
103	SKQEGCRL2APGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	369
104	S2GSRCSDDQVGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	364
105	EGCRL2APLRGGSGGRKCRPGFGVAR	CYS.S	358
106	2LS2GSRCSDDGGSGGQNRIC2RPGW	CYS.S	345
107	WY2ALSKQEGCGGGSGGPLRKCRPGFGV	CYS.S	341
108	QEGCRL2APLRGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	340
109	WY2ALSKQEGCGGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	327

FIG. 3B (continuación)

110	ALSKQEGCRL2GGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	321
111	EGCRL2APLRKGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	312
112	Y2ALSKQEGCRGGSGG2APLRKCRPGF	CYS.S	308
113	LS2GSRCSDDQGGSGGNRICT2RPGW	CYS.S	291
114	LSKQEGCRL2AGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	253
115	RCSSDQVETOAGGSGGNRICT2RPGWY	CYS.S	247
116	KQEGCRL2APLGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	242
117	SKQEGCRL2APGGSGGAPLRKCRPGFG	CYS.S	220

FIG. 4. Visualización de epítomos unidos por anticuerpos contra TNFR2

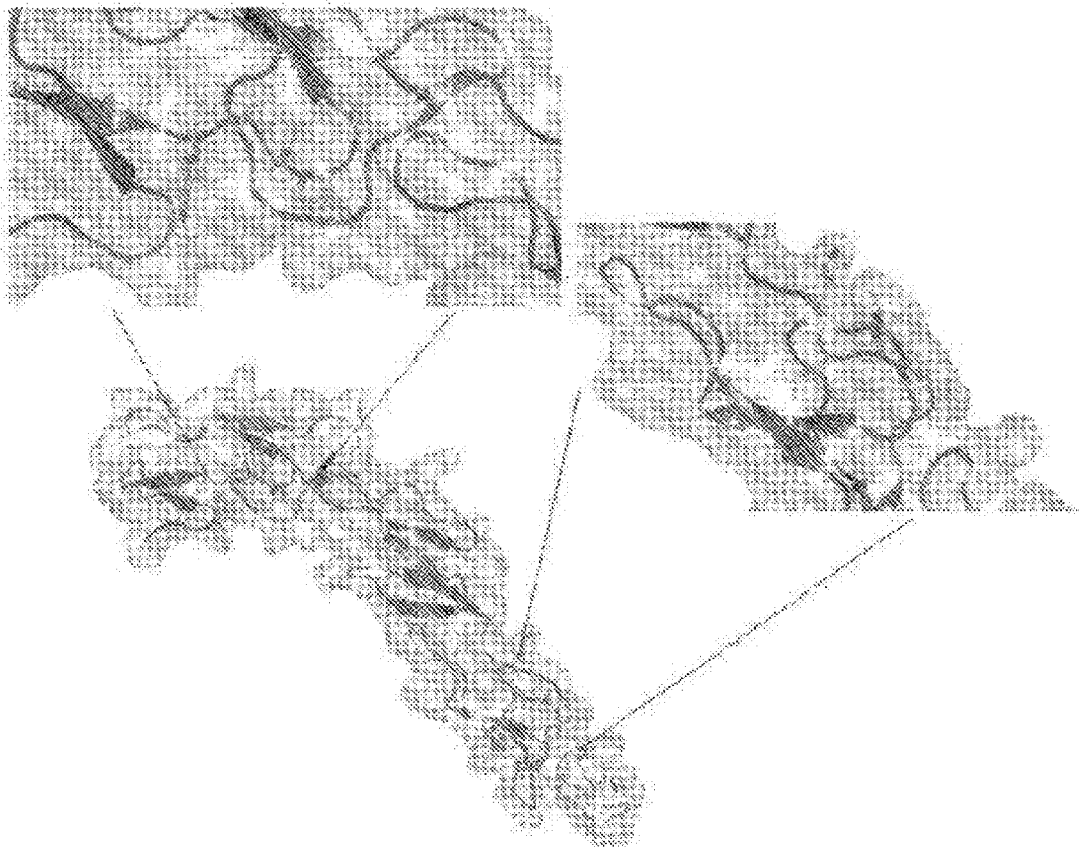


FIG. 5. Ensayo de supresión de T-reg

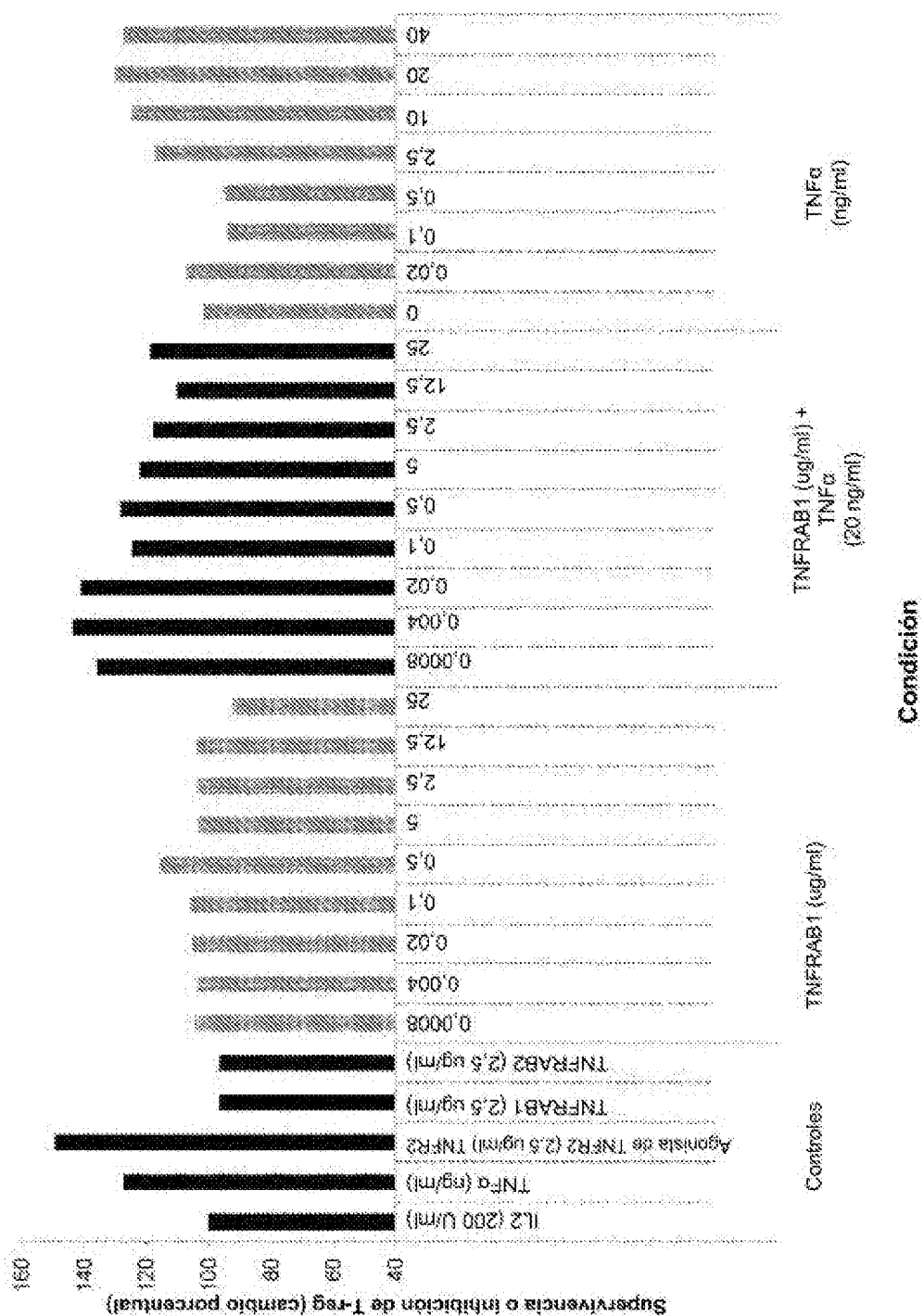


FIG. 6A

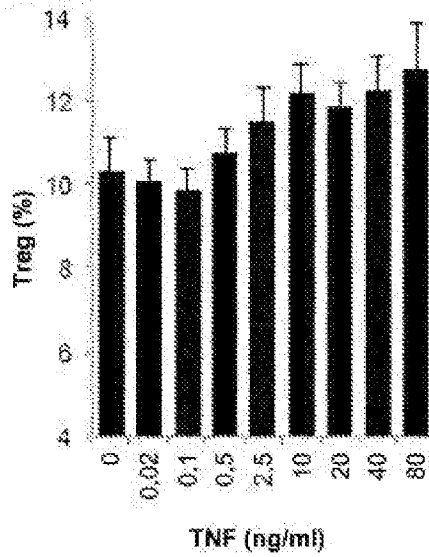


FIG. 6B

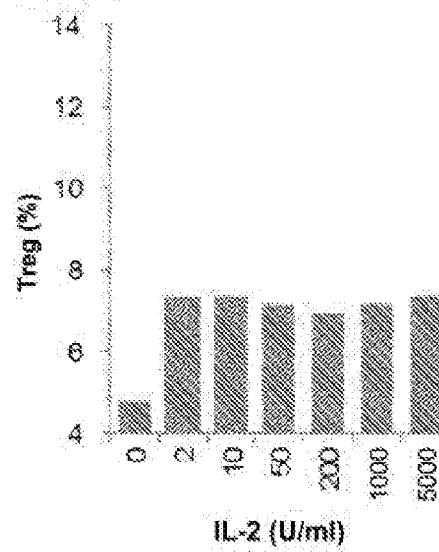


FIG. 6C

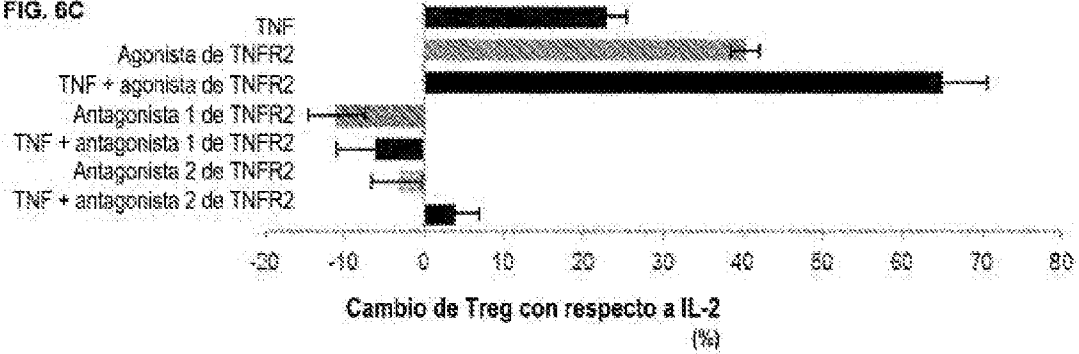


FIG. 6D

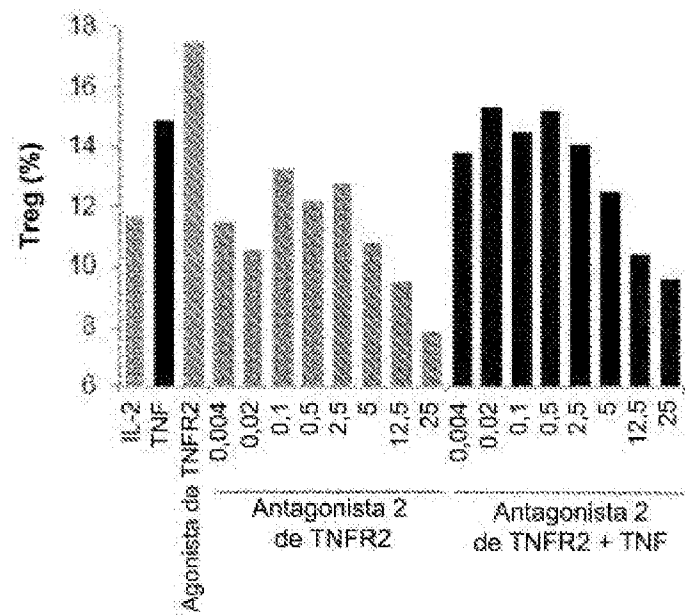


FIG. 6E

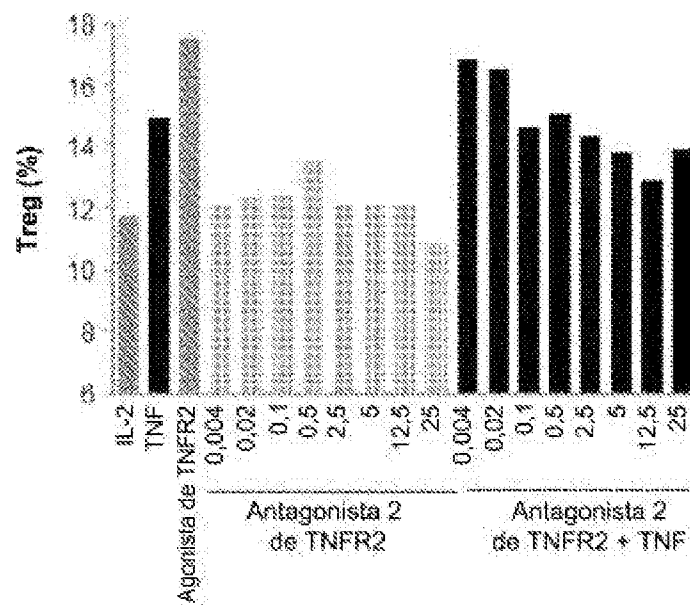


FIG. 6F

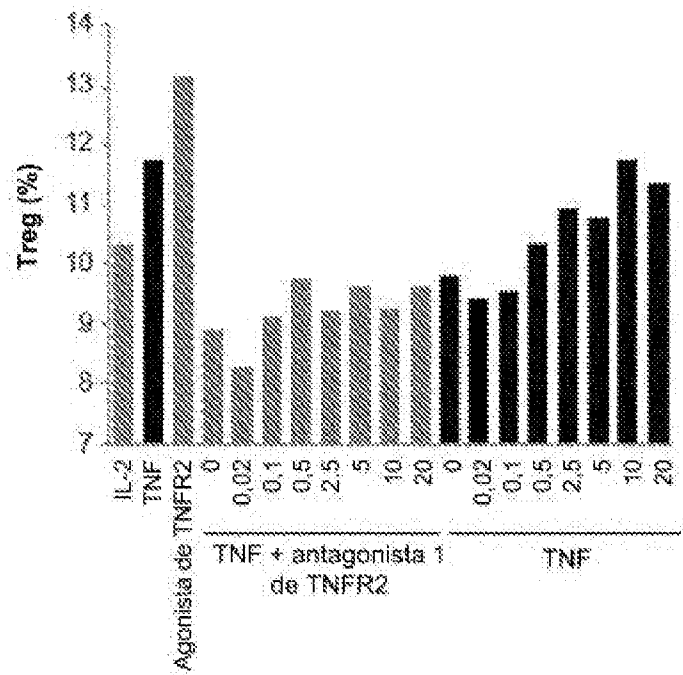
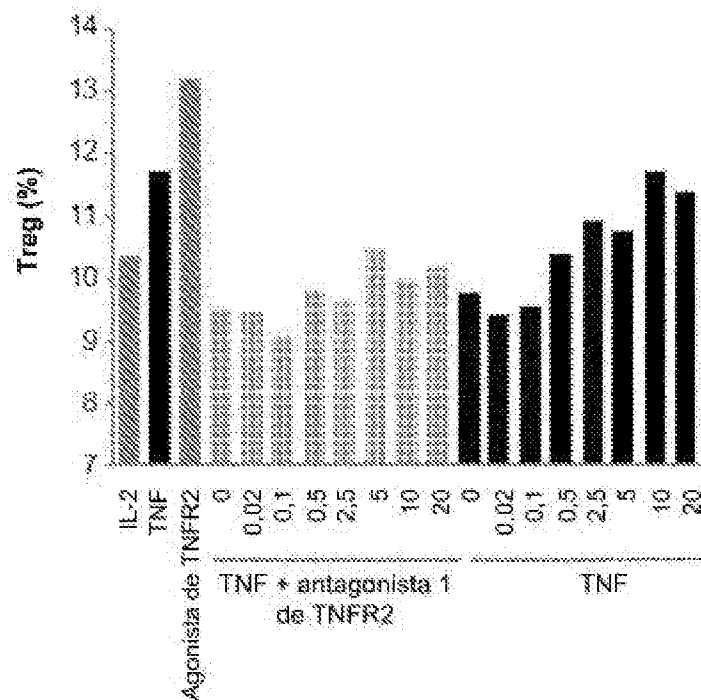


FIG. 6G



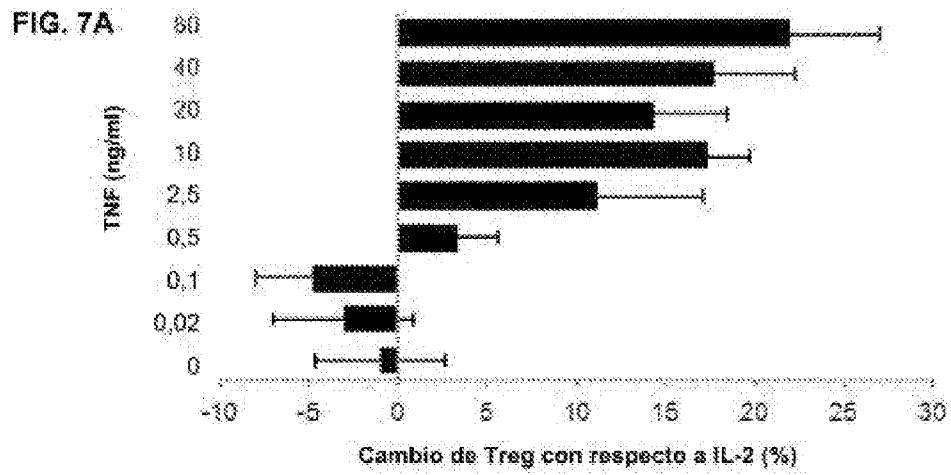


FIG. 7B

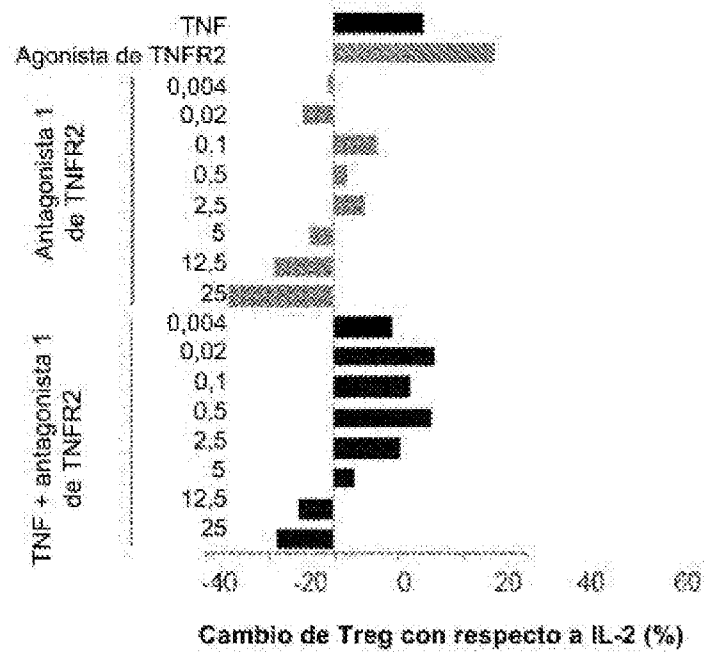


FIG. 7C

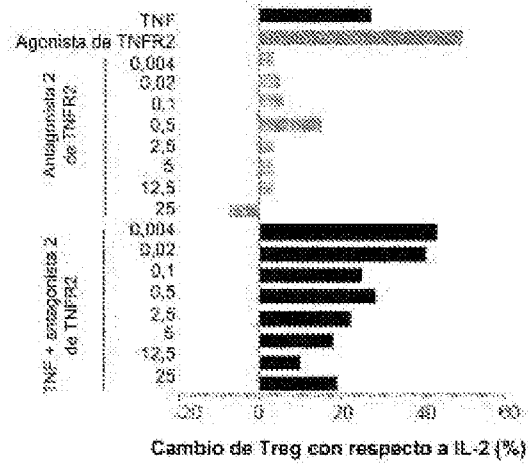


FIG. 7D

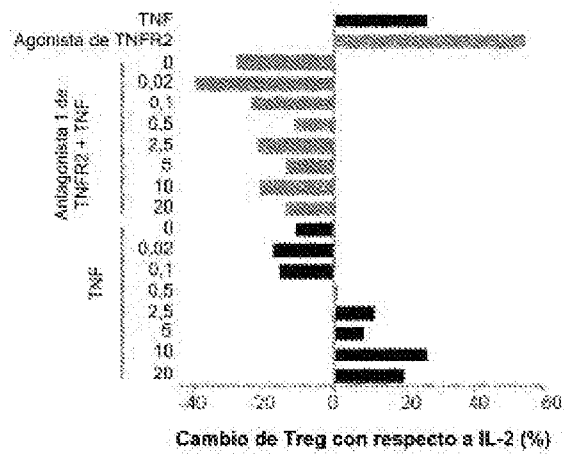


FIG. 7E

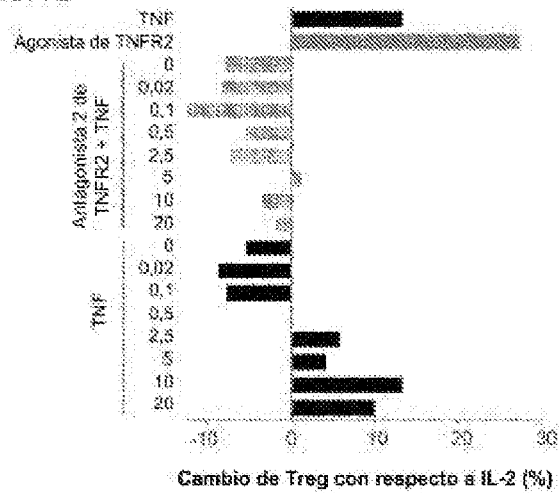


FIG. 8A

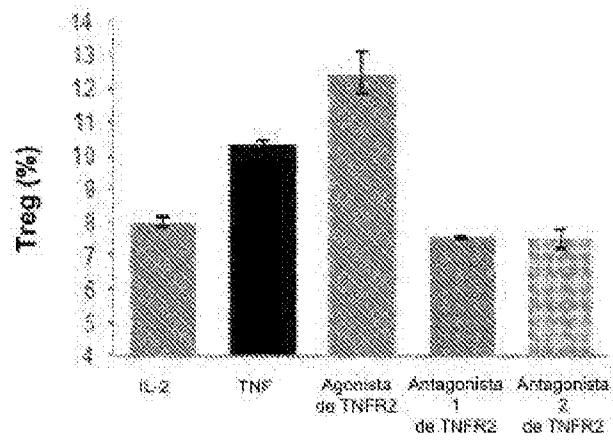


FIG. 8B

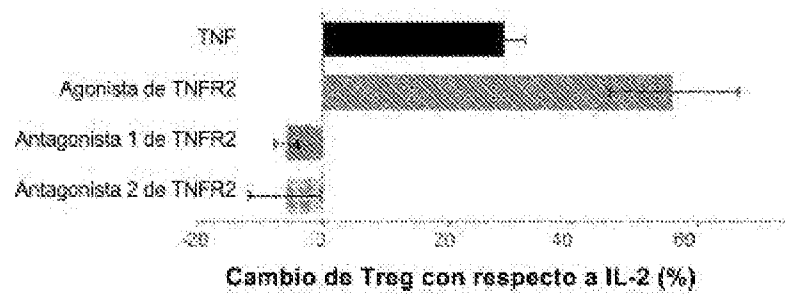


FIG. 8C

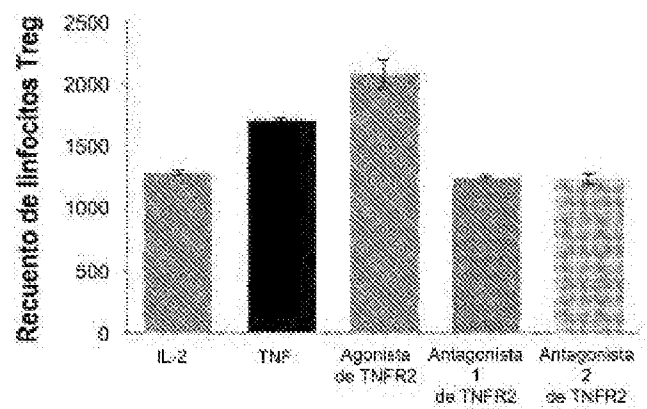


FIG. 8D

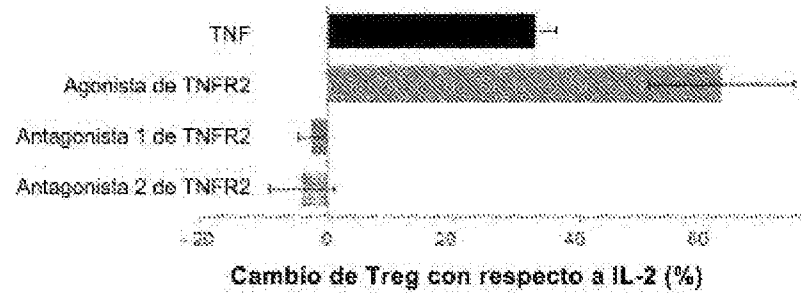


FIG. 8E

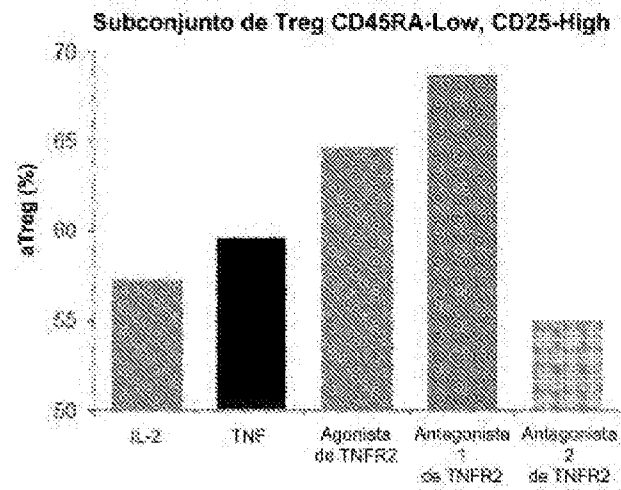


FIG. 8F

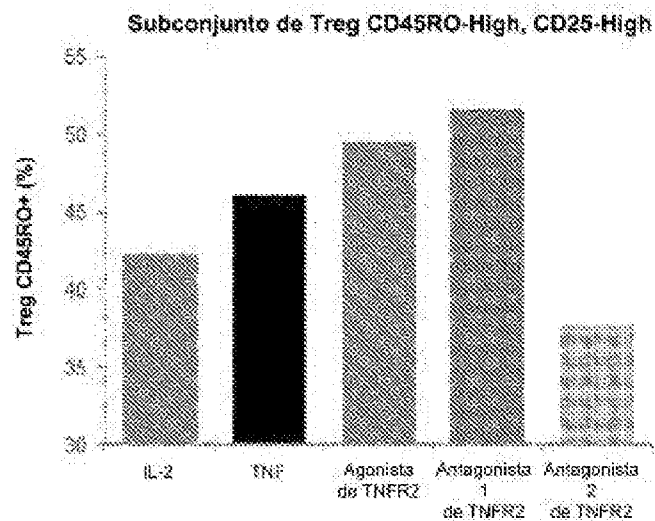


FIG. 8G

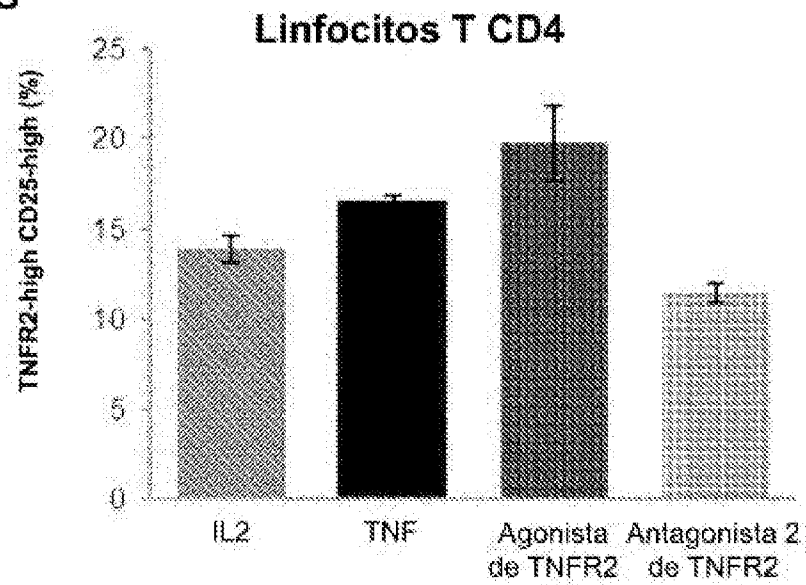
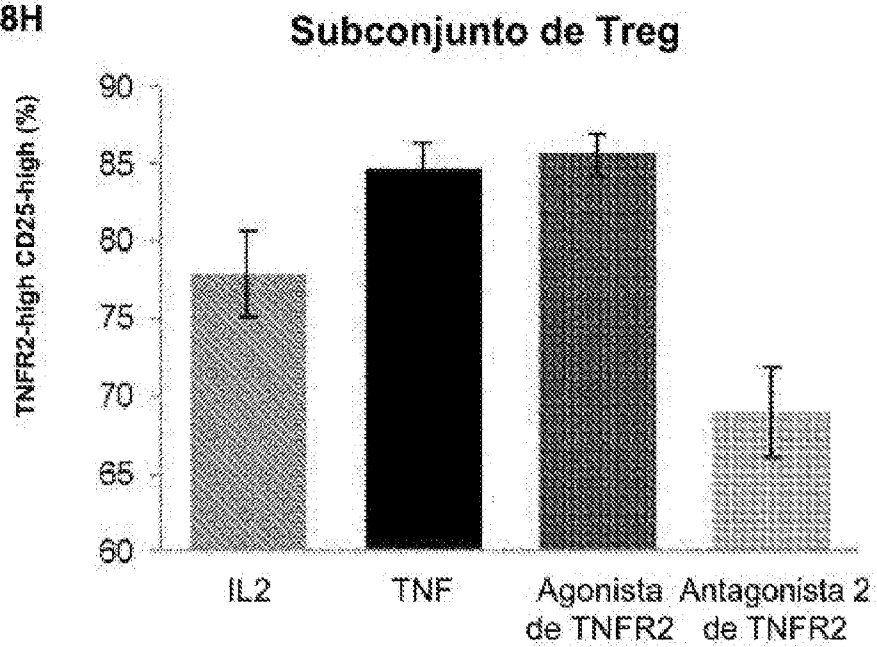


FIG. 8H



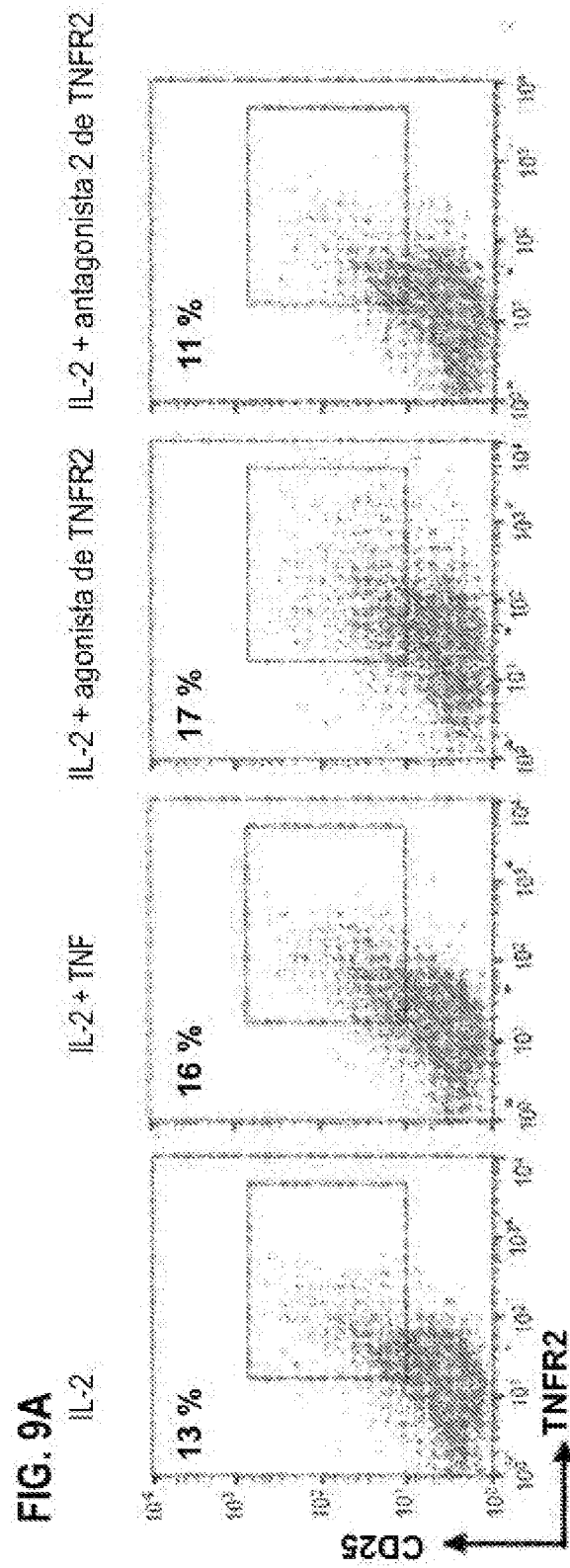


FIG. 9B

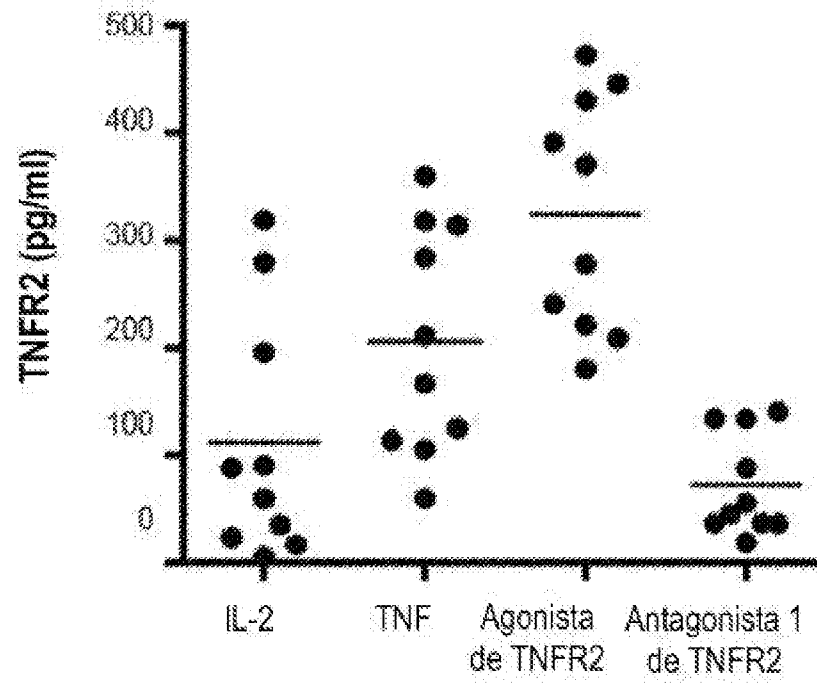


FIG. 9C

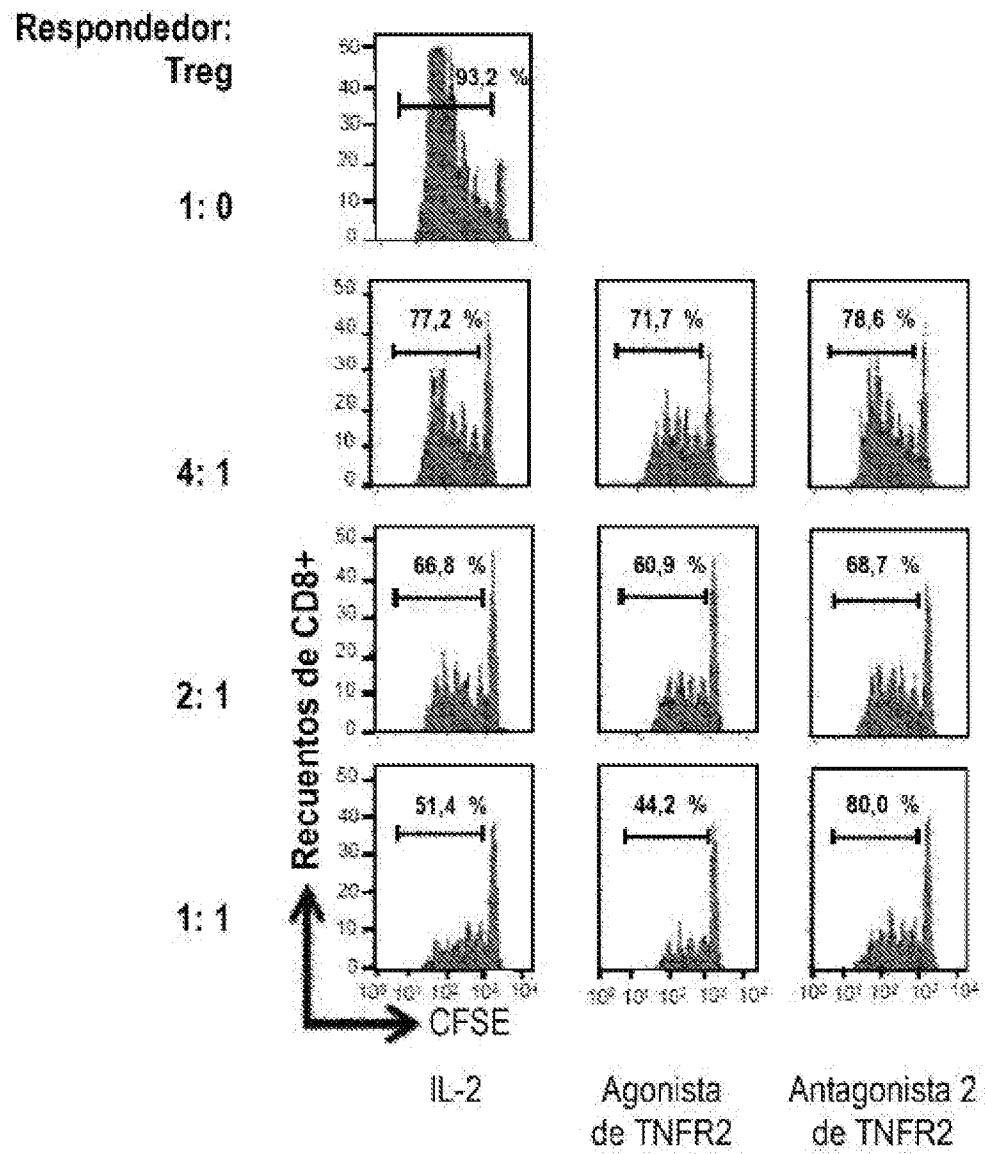


FIG. 10A

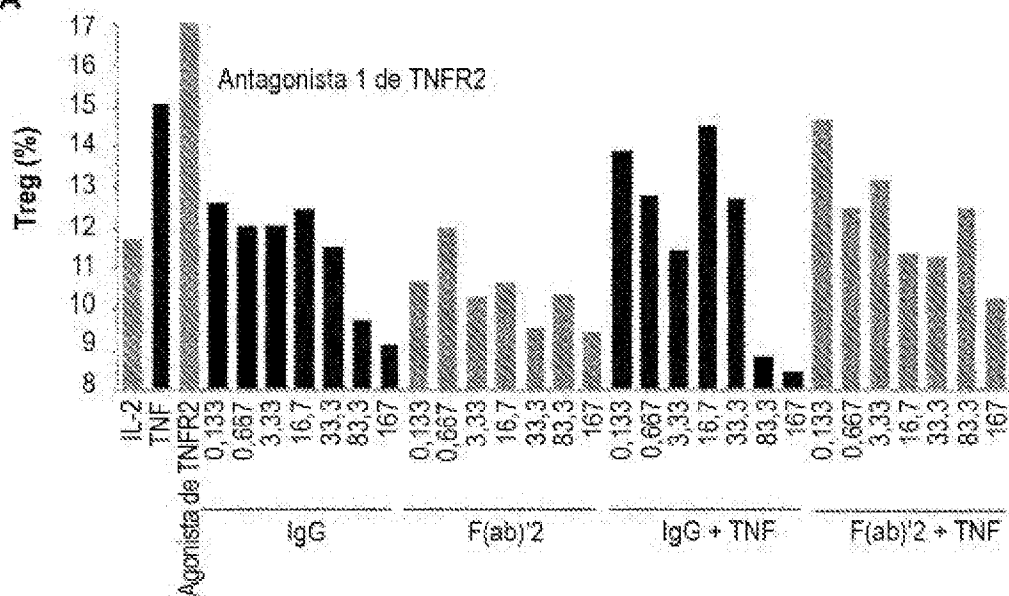


FIG. 10B

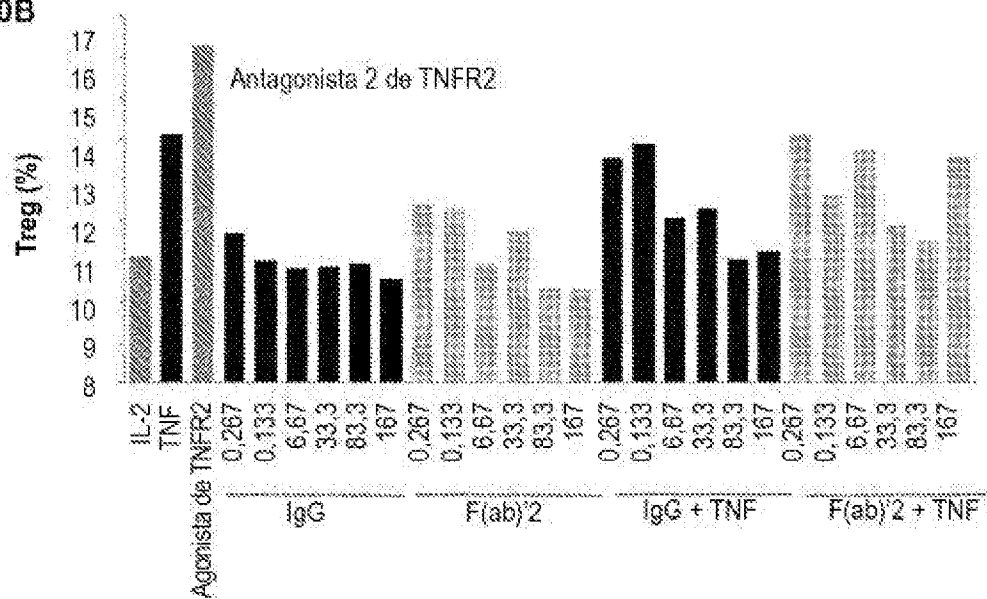


FIG. 10C

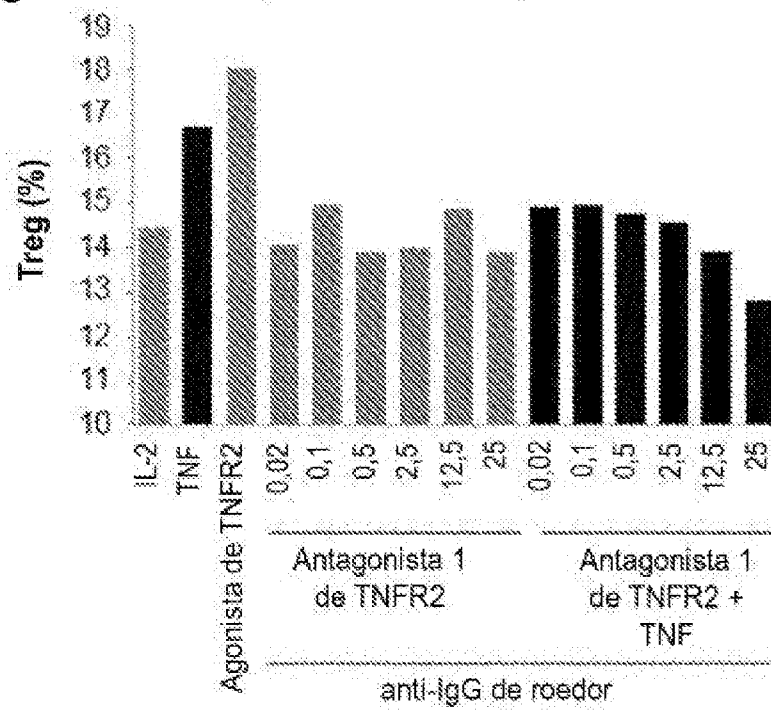


FIG. 10D

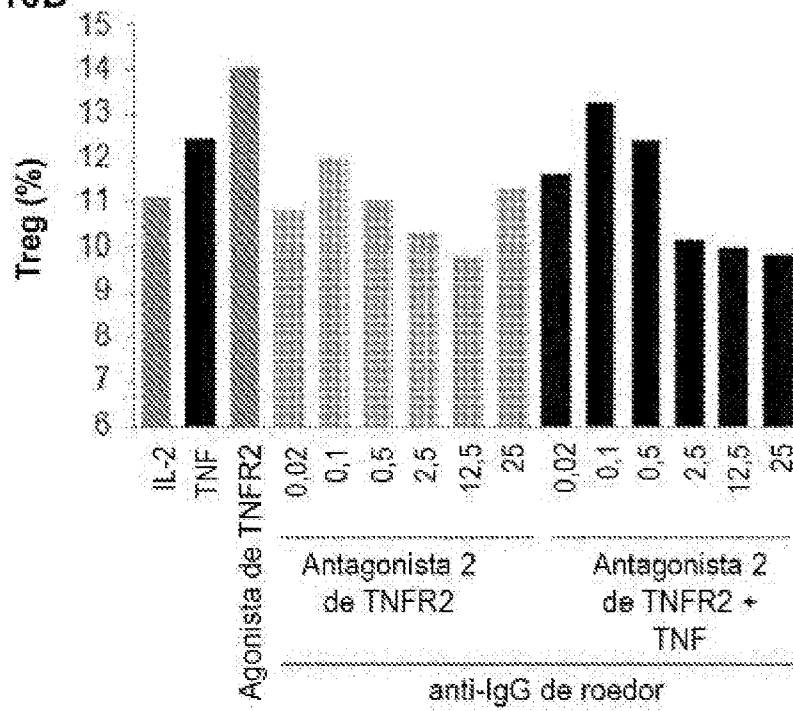


FIG. 11A

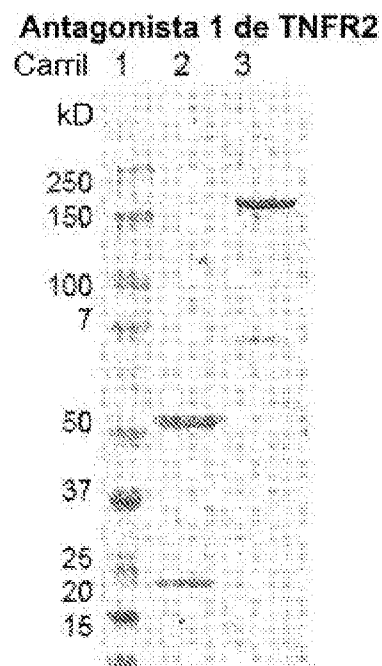
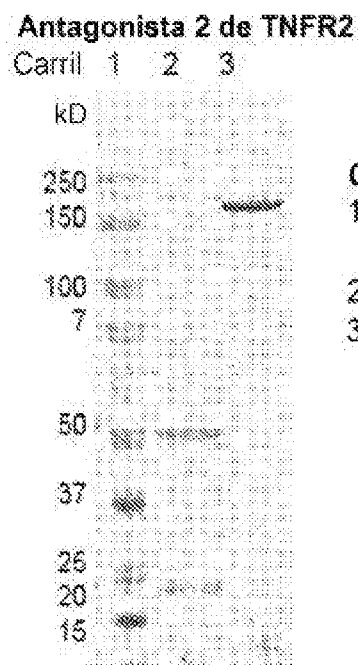


FIG. 11B



Carril

1. Marcador de proteínas Precision Plus (10 ul)
2. Reducido (2,5 ug)
3. No reducido (2,5 ug)

FIG. 11C

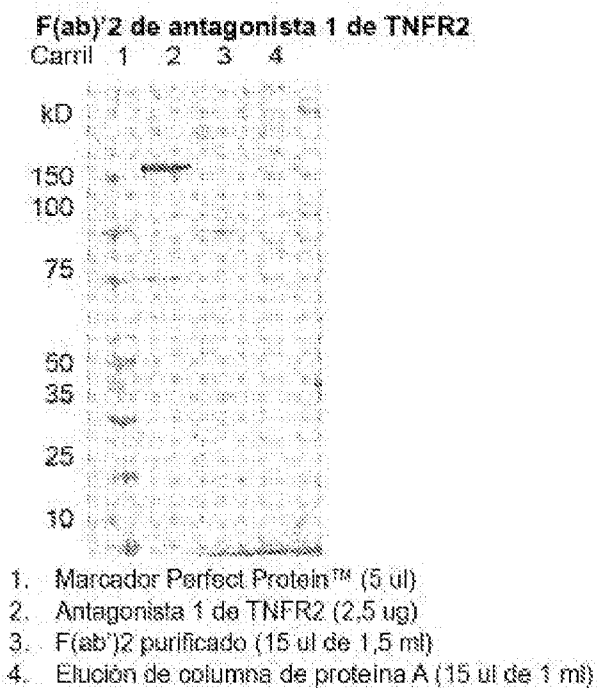


FIG. 11D

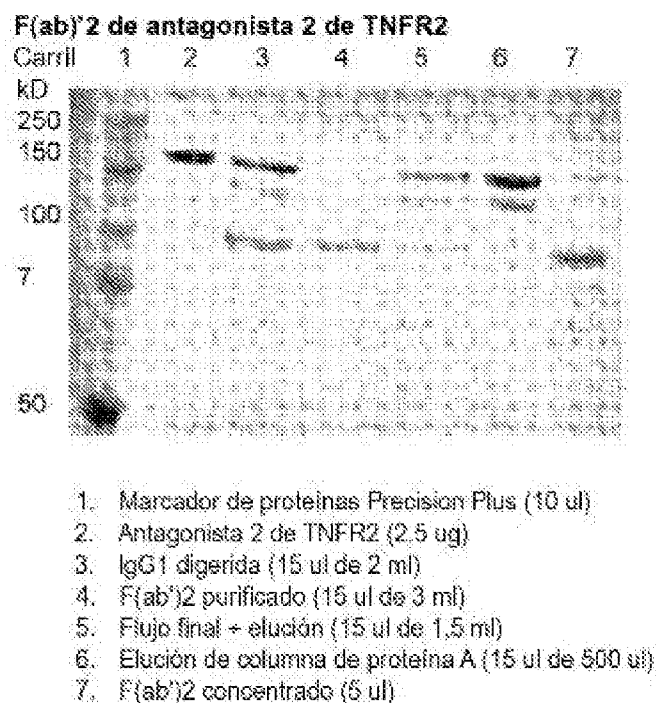


FIG. 12A

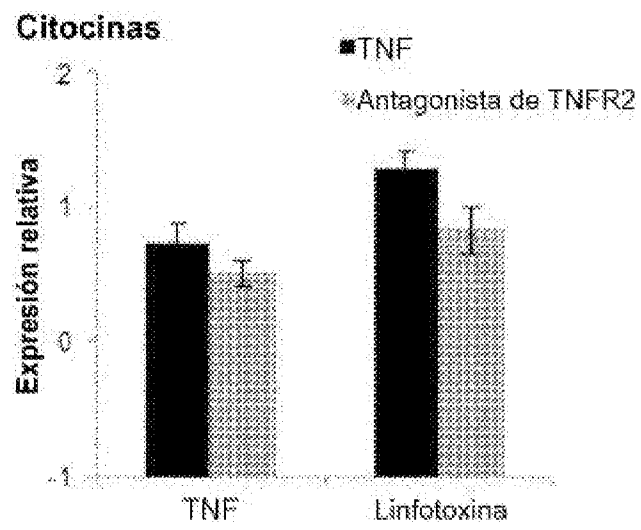


FIG. 12B

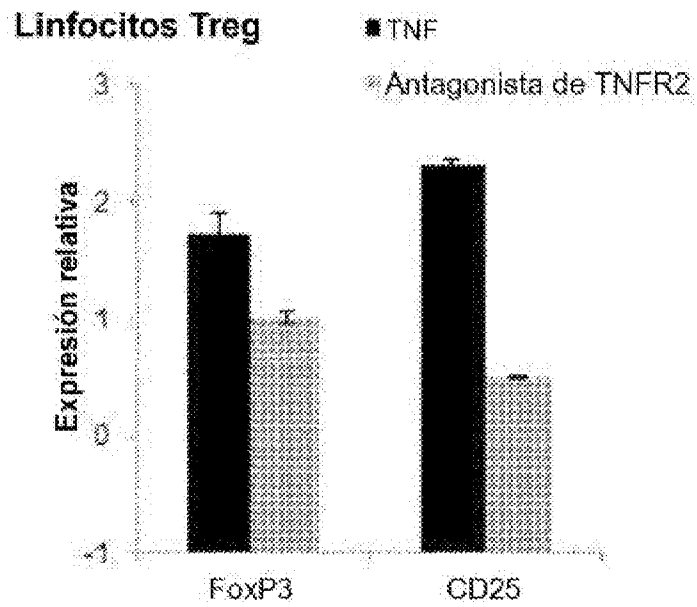


FIG. 12C Promotores de la activación de NFkB

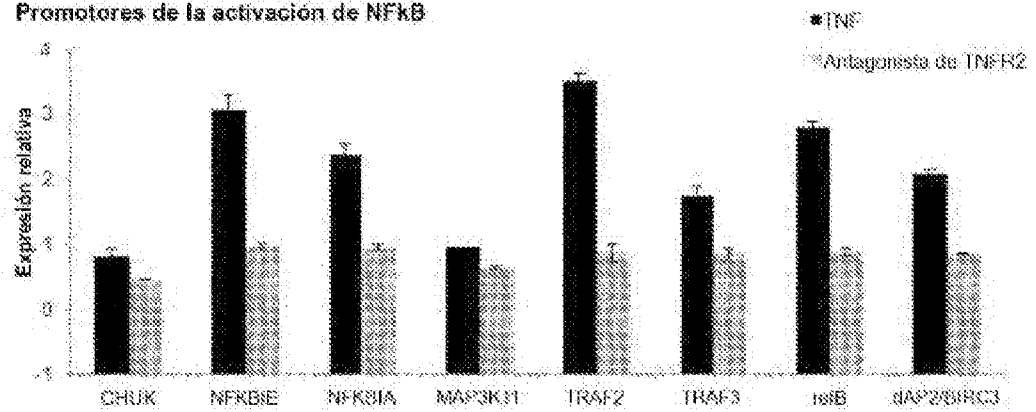


FIG. 12D

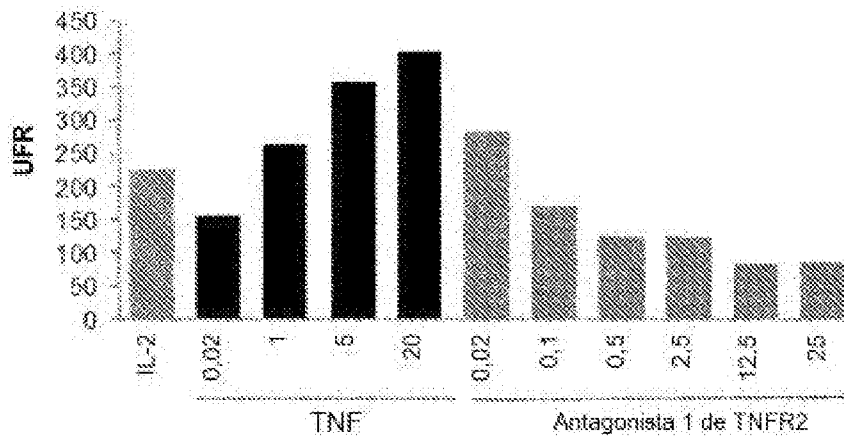


FIG. 12E

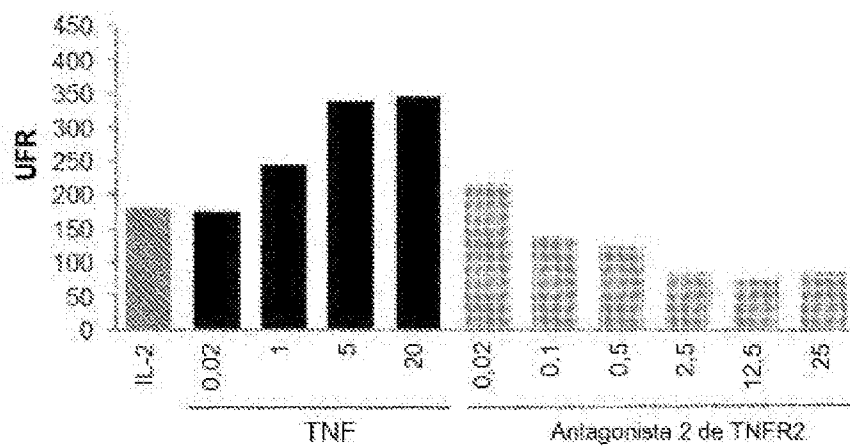


FIG. 13A

Afinidad de unión de antagonistas a TNFR2

Antagonista de TNFR2	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (M)
1	4,98E+06	2,21E-04	4,44E-11
2	3,609(9)E+05	2,24E-04	6,21(2)E-10

$k_{on} = k_a$ – constante de velocidad de asociación

$k_{off} = k_d$ – constante de velocidad de disociación

K_D – constante de disociación de equilibrio

FIG. 13B

Mapeo lineal de péptidos de antagonistas del TNFR2

Péptido	Posición	Secuencia	Antagonista 1 de TNFR2		Antagonista 2 de TNFR2	
			Afinidad	lectura	Afinidad	lectura
TNFR2	NTNFR2 (23-207)	20K0	++++	1,2	++++	1,2
S04082	NTNFR2 (1-20)	LPAGVAFTPYAPEPOSTORL	-	0	-	0
S04081	NTNFR2 (9-38)	PYAFERVSTORLREYYDQTA	-	0	-	0
S04083	NTNFR2 (17-36)	TCRLREYYDGTAGMODSKCS	-	0	-	0
S04083	NTNFR2 (26-45)	GTAQMOCCKCSPGQAKVPC	-	0,1	-	0
S04084	NTNFR2 (34-53)	KCSFGQHAQVFDTKTSQTVG	-	0	-	0
S04085	NTNFR2 (42-61)	KVFCITKTSQTVGDSCEQSTY	-	0	-	0
S04086	NTNFR2 (50-69)	QTVGDSCEQSTYQLVWVWP	-	0	-	0
S04087	NTNFR2 (58-77)	QSTYQLVWVWPECLSCGSR	-	0	-	0
S04088	NTNFR2 (66-85)	HWVPECLSCGSRCSQVET	-	0	-	0
S04089	NTNFR2 (74-93)	CGSRCSQVETQACTREQH	-	0	-	0
S04090	NTNFR2 (82-101)	QVETQACTREQNRICTCRPG	-	0	-	0
S04091	NTNFR2 (90-109)	REQNRICTCRPQWYCALSKQ	++	0,5*	-	0
S04092	NTNFR2 (98-117)	CRPQWYCALSKQEGCRLCAP	++	0,2*	-	0
S04093	NTNFR2 (106-125)	LSKQEGCRLCAPLRKCRPGF	+++++	1,2*	-	0
S04095	NTNFR2 (106-127)	KQEGCRLCAPLRKCRPGFQV	+++++	1,2	-	0
S04094	NTNFR2 (114-133)	LCAPLRKCRPGFQVAFQTE	+++++	1,2*	-	0
S04095	NTNFR2 (122-141)	RPQFGVARRPGTETSDVWCKP	-	0	-	0
S04096	NTNFR2 (130-149)	PGTETSDVWCKCAPGTFSN	-	0	-	0
S04097	NTNFR2 (136-157)	VCKPCAPGTFSNTTSTEDIC	-	0	-	0
S04098	NTNFR2 (146-165)	TFSNTTSTEDICRPHQCNV	-	0	-	0
S04099	NTNFR2 (154-174)	TQCRPHQCNVVAIPGNAS	-	0	-	0
S04080	NTNFR2 (162-181)	ICNVVAIPGNASMDAVCTST	-	0	-	0
S04081	NTNFR2 (170-189)	GNASMDAVCTSTSPTRSNAP	-	0	-	0

*Preparación (2x)

FIG. 13C

Mapeo lineal de péptidos de antagonistas de TNFR2 en competencia con TNF

Péptido	Posición	Secuencia	Antagonista 1 de TNFR2		Antagonista 2 de TNFR2	
			Afinidad	vs. TNF	Afinidad	vs. TNF
S04053	NTNFR2(3-43)	QTAGMCCSKOSPGQNAKYFD	+	Sin efecto	-	nd
S04071	NTNFR2(90-109)	REQNRICTRPGWYCALSKQ	++	Sin efecto	-	nd
S04072	NTNFR2(98-117)	CRPGWYCALSKQEGCRLCAP	++	Sin efecto	-	nd
S04073	NTNFR2(106-125)	LSKQEGCRLCAPLRKKRPGF	++++	Sin efecto	-	nd
S04075	NTNFR2(108-127)	NQEGCRLCAPLRKKRPGFQV	++++	Sin efecto	-	nd
S04074	NTNFR2(114-133)	LCAPLRKKRPGFGVRRPQTE	++++	Sin efecto	-	nd

FIG. 14A

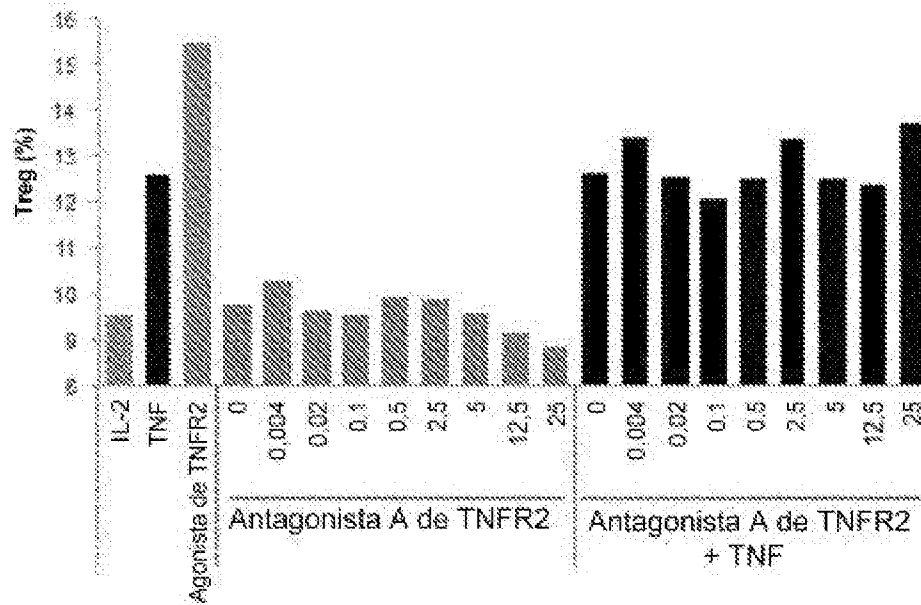


FIG. 14B

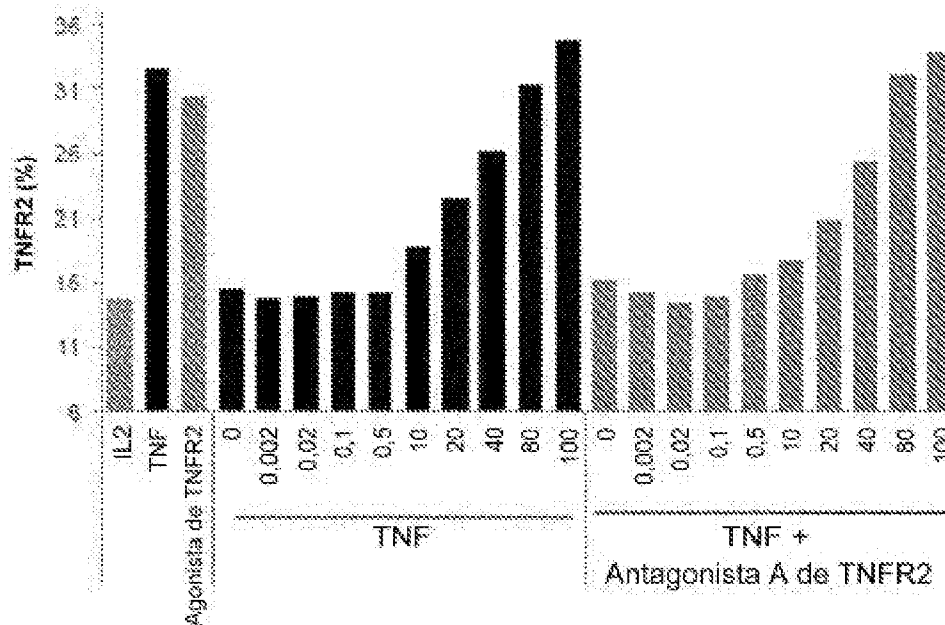


FIG. 14C

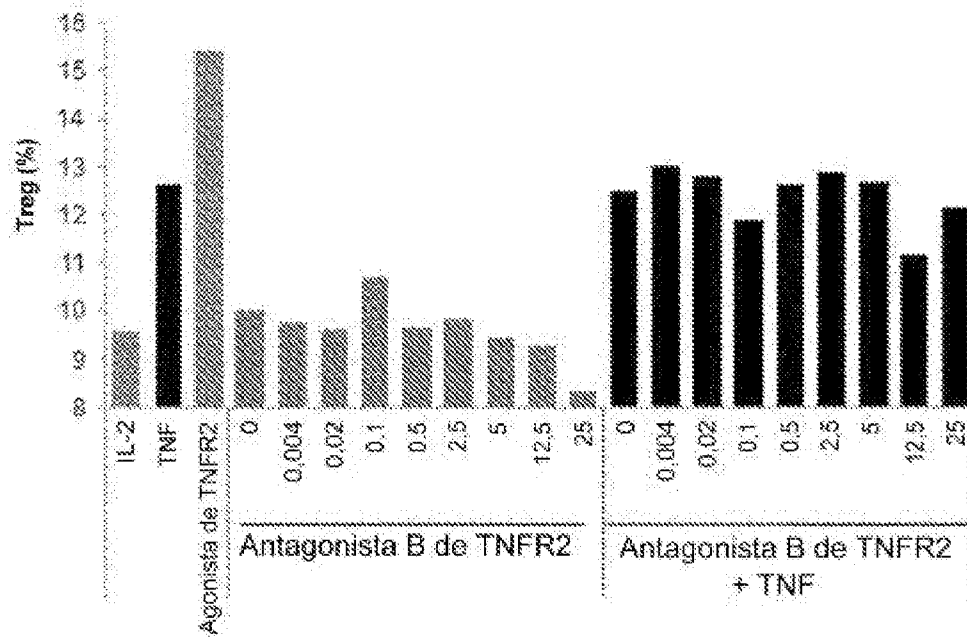


FIG. 14D

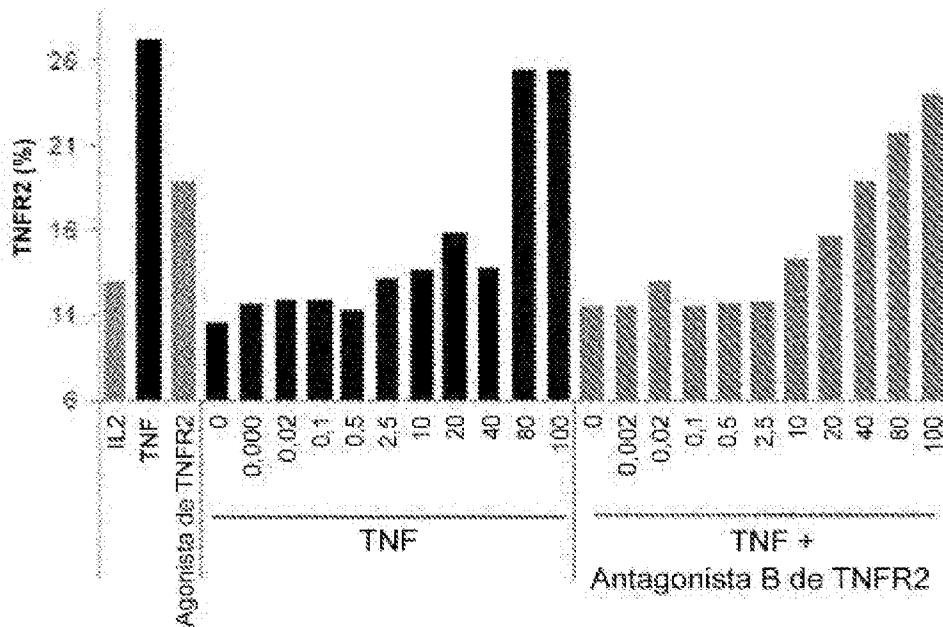


FIG. 15A Antagonista de TNFR2

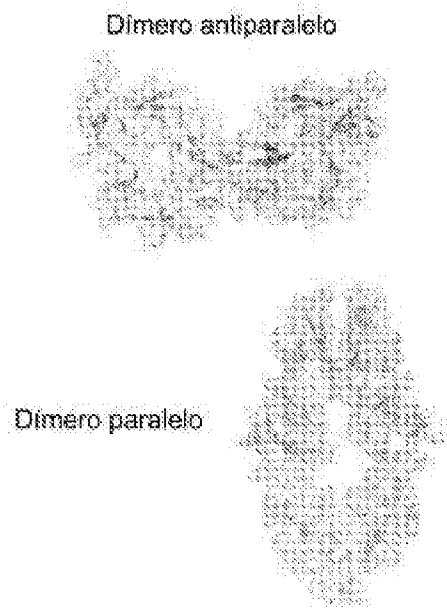


FIG. 15B



FIG. 15C

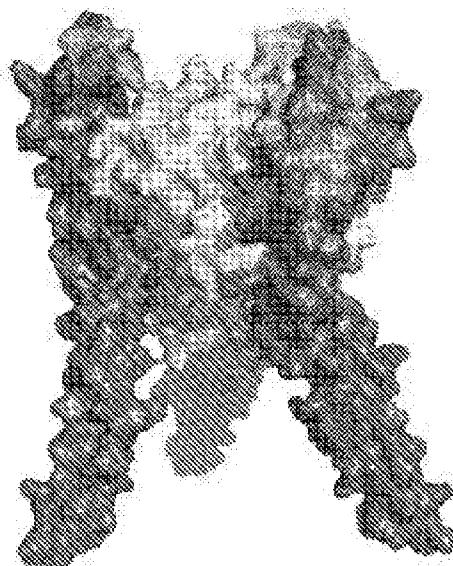


FIG. 16A

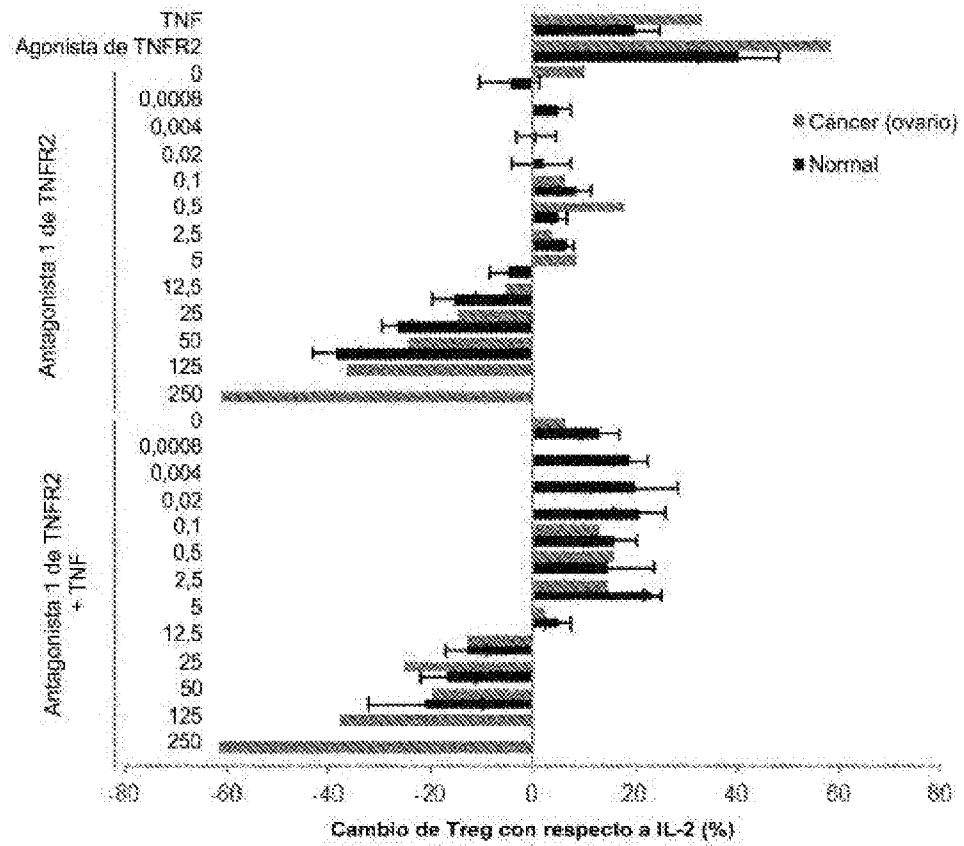


FIG. 16B

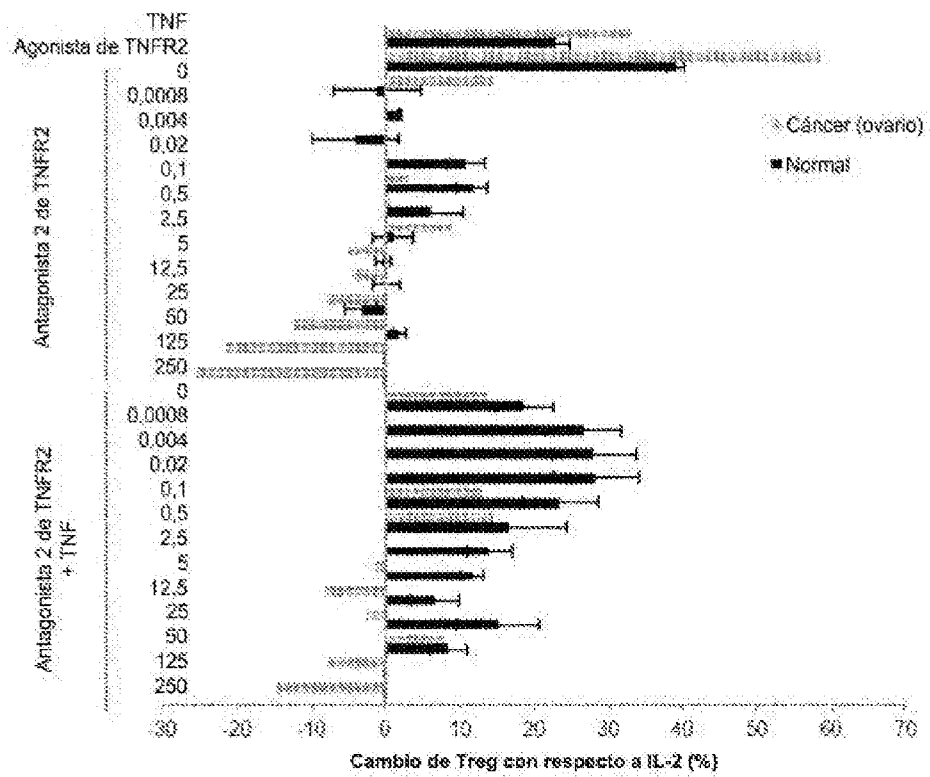


FIG. 17A

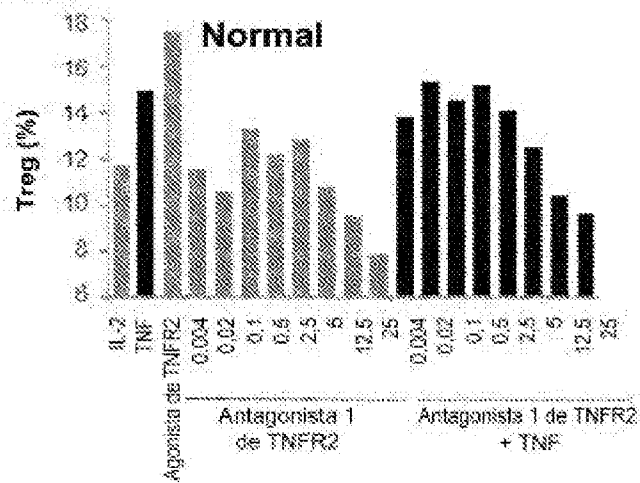


FIG. 17B

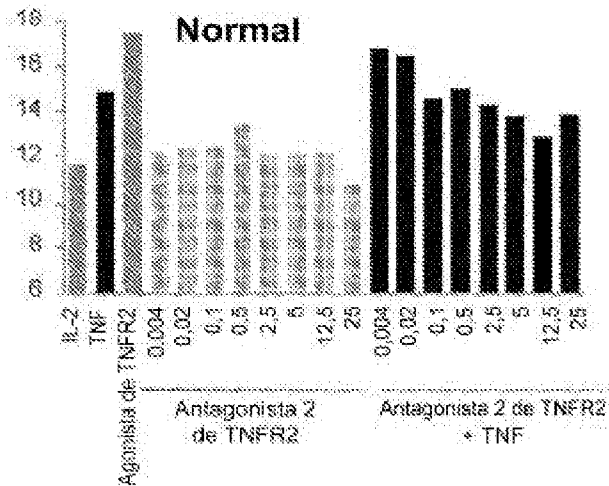


FIG. 17C

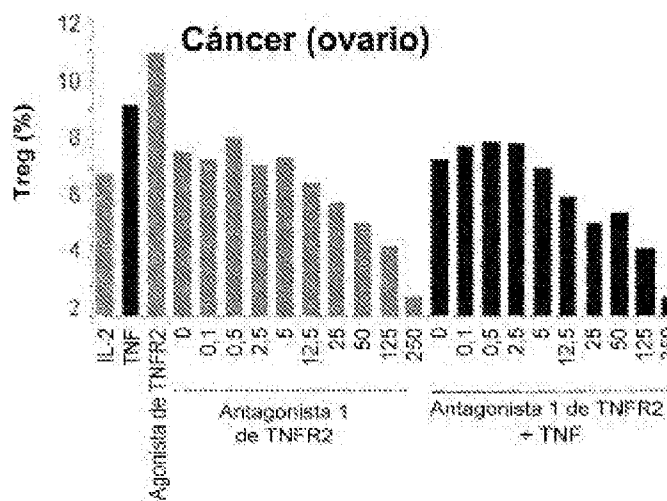


FIG. 17D

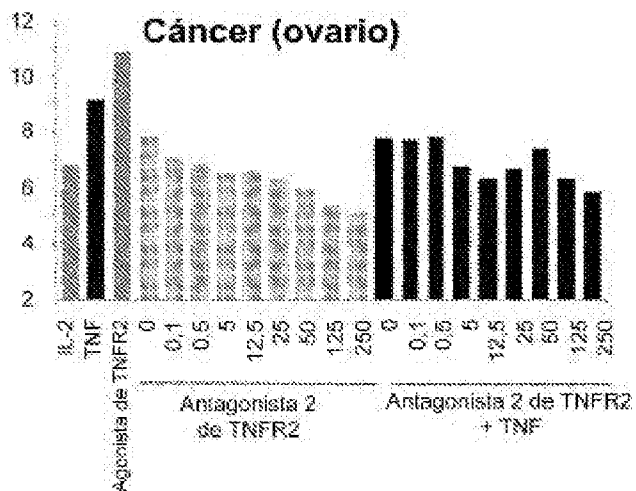


FIG. 17E

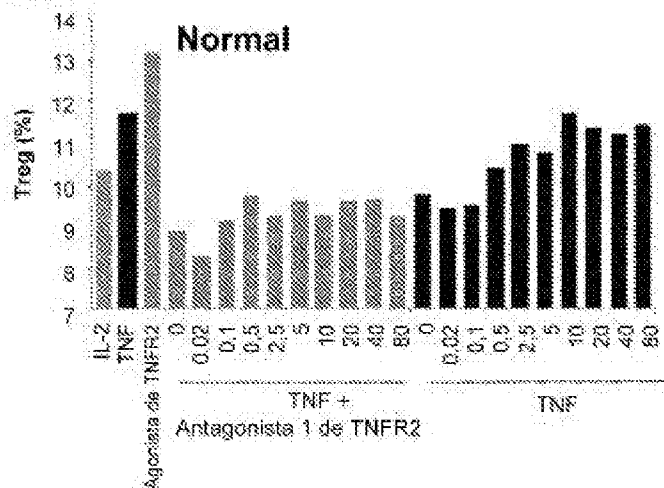


FIG. 17F

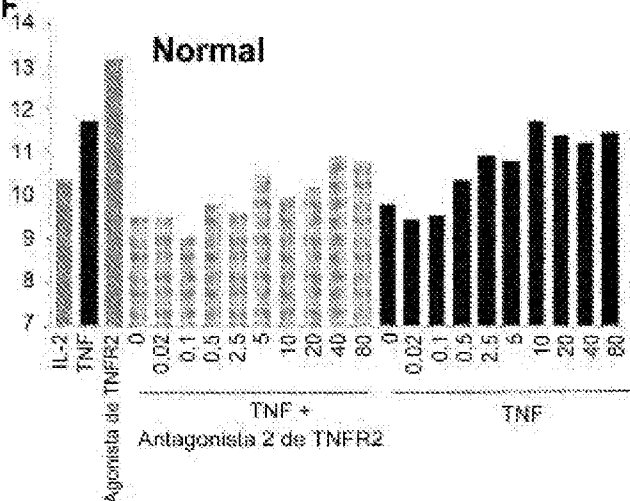


FIG. 17G

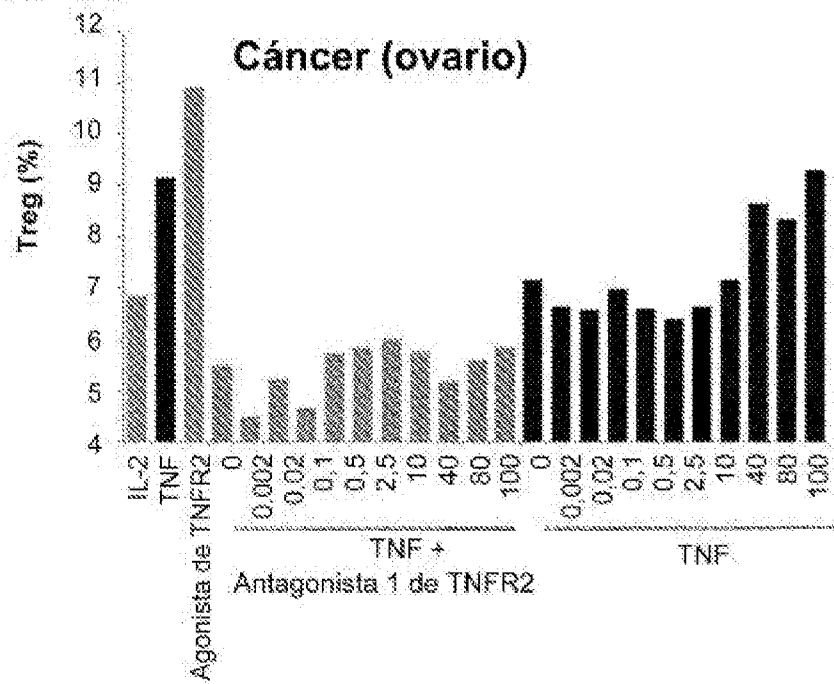


FIG. 17H

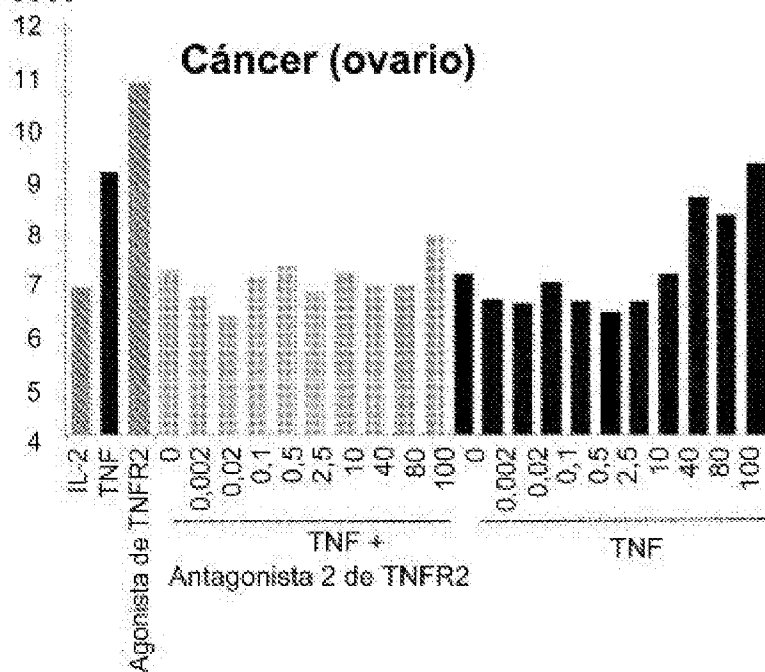


FIG. 18A

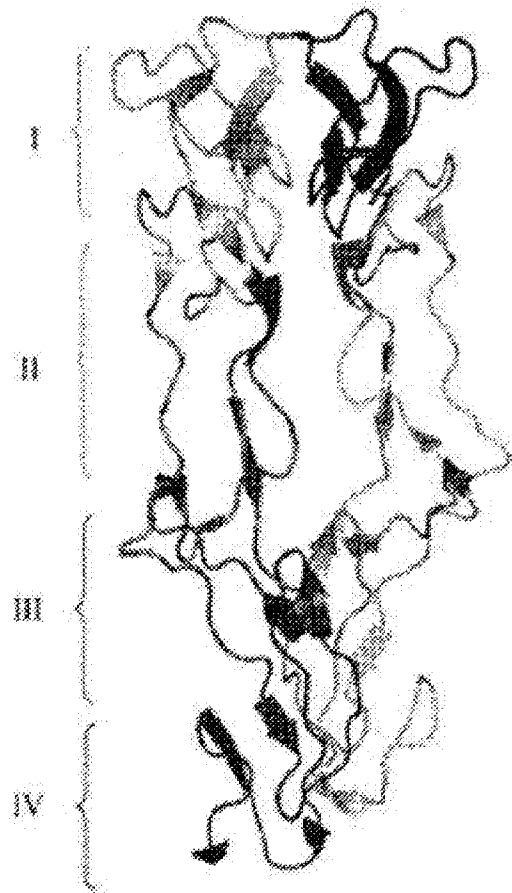


FIG. 18B

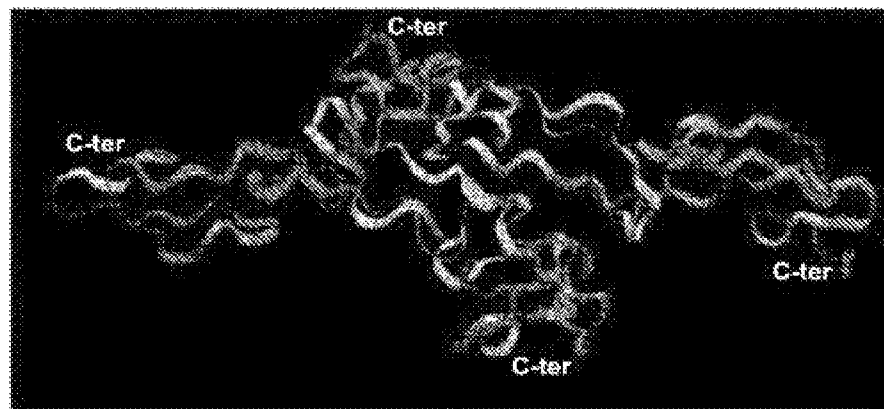


FIG. 18C

