



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 273**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06709799 .8**
(96) Fecha de presentación : **17.02.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1863849**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

(54) Título: **Control de plagas de roedores.**

(30) Prioridad: **11.03.2005 GB 0505054**
13.01.2006 GB 0600719

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

(73) Titular/es: **SYNGENTA LIMITED**
European Regional Centre Priestley Road Surrey
Research Park
Guildford Surrey GU2 7YH, GB

(72) Inventor/es: **Cayley, Patricia, Jane;**
Dinsmore, Andrew, John;
Earley, Fergus, Gerard, Paul;
Sadler, Claire, Judith, Anne y
Vincent, Jason, Leigh

(74) Agente: **De Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 367 273 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

Control de plagas de roedores.

La presente invención se refiere a nuevos agentes de control de roedores que comprenden anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de éstos, que se unen a proteínas expresadas en roedores y, en particular, a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen a proteínas expresadas en el tracto gastrointestinal (GI) de roedores, así como a métodos para preparar dichos nuevos agentes de control de roedores. La invención se extiende además a nuevos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno para usarse en el control de roedores así como a métodos para controlar roedores mediante el uso de dichos anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y nuevos agentes de control de roedores.

Se ha admitido desde hace tiempo que los roedores son plagas y causan numerosos problemas. Frecuentemente, hurgan en busca de su alimento a partir del que está destinado a consumo humano y de animales domésticos, causando así daño a y contaminando (con orina, heces y enfermedad) no sólo los cultivos en crecimiento, sino también materiales alimenticios almacenados. También se sabe que los roedores son portadores de una amplia variedad de enfermedades incluyendo por ejemplo, Triquinosis, Leptospirosis, Cólera, Peste Bubónica, Tifus, Disentería, Hantavirus, Salmonellosis, Pasteurellosis, Toxoplasmosis, y Fiebre por mordedura de rata, que pueden extenderse bien mediante contacto directo (p. ej. mediante mordeduras) o indirecto (p. ej. mediante el polvo generado por las heces, orina, y/o saliva, y/o insectos que viven en o que se alimentan de roedores etc.) a seres humanos y/o otra especie de mamífero. Además, los roedores causan frecuentemente daños físicos a propiedades, instalaciones y equipos royendo y escarbando.

Los métodos para controlar roedores han surgido así con el tiempo y pueden dividirse en general en tres categorías: i) captura; ii) muerte mediante la exposición a agentes químicos; y iii) esterilización o reducción de la capacidad de los roedores para reproducirse. Estas tres metodologías presentan una o más deficiencias.

Por ejemplo, las trampas mecánicas que están diseñadas para capturar y/o matar roedores están por su naturaleza limitadas en su uso por el número de animales del que pueden encargarse, es decir, pueden ser sólo capaces de encargarse de un animal cada vez antes de que se requiera su reajuste por intervención humana. Cuando se considera la alta velocidad a la que se pueden reproducir los roedores (con un tamaño de camada medio de 6-8 y entre 10 y 12 camadas por año, una única pareja de ratas puede producir hasta 15.000 descendientes en un año) puede observarse que la captura no es adecuada para infestaciones grandes.

Además, la captura es relativamente trabajosa y requiere una intervención humana regular y esto da lugar no sólo a un coste incrementado del control de plagas sino que también puede ahuyentar a los roedores a los que van dirigidas las trampas.

El uso de rodenticidas químicos es actualmente el método principal para los programas prácticos de control de roedores tanto en entornos urbanos como agrícolas. En general, los rodenticidas químicos son agudos o crónicos en su acción, es decir, el compuesto químico media toxicosis bien rápidamente o lentamente después de que el roedor haya ingerido una dosis eficaz. Los rodenticidas agudos incluyen fosfuro de cinc, fosfuro de tricinc, escila roja (ingrediente activo escilirósido), (mono) fluoroacetato de sodio, fluoroacetamida, alfacloralosa y sulfato de talio. Algunos compuestos químicos rodenticidas, tales como caliciferol, brometalina y flupropadina, pueden describirse como rodenticidas subagudos porque se ingiere una dosis letal en las primeras 24 horas, pero se produce la alimentación reiterada y la muerte se retrasa normalmente varios días, aunque la distinción entre rodenticidas que actúan de forma aguda y subaguda no está siempre clara. Aunque los rodenticidas agudos son ventajosos porque actúan muy rápidamente, son en general compuestos químicos muy tóxicos y existen problemas de seguridad y medioambientales asociados con su uso. Además, los supervivientes de cebos con veneno agudo pueden volverse reticentes al cebo, reduciendo así la eficacia global de este método de control de roedores.

Los rodenticidas crónicos median su efecto actuando como anticoagulantes, ejemplos de éstos incluyen los anticoagulantes de primera generación hidroxicumarinas (p. ej. warfarina, cumaclor, cumatetrililo) e indano-dionas (p. ej. pindona, difacinona, clorfacinona); y los anticoagulantes de segunda generación bromadiolona, brodifacum, difenacum, flocumafen y difetialona. El uso de rodenticidas de segunda generación ha sido extensivo durante las últimas 2 a 3 décadas y aún mayor (3 a 5 décadas) para los anticoagulantes de primera generación. Así, las poblaciones de roedores han tenido mucho tiempo para desarrollar resistencia a este método de control y se ha indicado resistencia/tolerancia para cada uno de los ingredientes activos mencionados anteriormente en varias poblaciones y/o especies de roedores (véase Kerrins *et al.*, 2001, "Distribution of resistances to anticoagulant rodenticides in England, 1995-98" p 149-159 Proceedings, Advances in Vertebrate Pest Management II, Second European Vertebrate Pest Management Conference, Braunschweig, Alemania).

Una desventaja adicional de los anticoagulantes de segunda generación surge de su modo de acción no específico de especie acoplado con su uso generalizado. Durante muchos años, han existido preocupaciones respecto al envenenamiento secundario de mamíferos y aves predadores y carroñeros que consumen roedores que portan restos de anticoagulante.

Tanto brodifacum como flocumafen han sido restringidos al uso interior en el Reino Unido ya que se piensa que presentan un alto riesgo inaceptable de envenenamiento secundario si se usan en el exterior. Sin embargo, la resistencia generalizada a difenacum y bromadiolona que se usan de forma más generalizada puede alentar el abuso de anticoagulantes potentes cuyo uso está restringido al interior. Más recientemente, se han observado niveles bajos de restos y un impacto letal de dichos restos en un amplio rango de especies no diana que tienen una importancia considerable en cuanto a la conservación, p. ej., Lechuzas, Armiños, Comadreja, Turones y Cernícalos.

Un tercer método de control de roedores que se ha propuesto, pero que todavía no ha conseguido ningún éxito comercial real, se basa en reducir el índice de natalidad de los roedores. Se ha investigado el uso de inhibidores de la reproducción, tales como contraceptivos y gametocidas, así como el uso de esterilizantes biológicos y químicos. Sin embargo, cada método presenta alguna desventaja. Por ejemplo, aunque el uso de compuestos químicos o esteroides como agentes antifertilidad ha demostrado ser exitoso para animales en cautividad, son más difíciles de emplear con poblaciones de plagas libres. Los compuestos tienen un sabor desagradable y así es difícil asegurar que los roedores obtienen una dosis adecuada. El gametocida alfaclorohidrina se ha comercializado como un tóxico-esterilizante, sin embargo, tiene efectos variables en diferentes especies y es tóxico (dando lugar hasta a un 50% de mortalidad) a dosis más altas. Las investigaciones más recientes han examinado la inmunocostrucción como un método de control de roedores (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EEUU No 2005/0009188; Moore & Wong 1997, *Reproduction Fertility & Development* 9:125-9; Smith *et al*, 1997, *Reproduction, Fertility & Development*, 9:85-9). Sin embargo, existen dificultades con la eficacia cuando la ruta de administración es oral, debido a problemas de tolerancia oral y pueden requerirse adyuvantes. WO01/58955 describe la destrucción dirigida de plagas mediante el suministro de un péptido dirigido frente a un epítipo antigénico de una célula diana del tracto gastrointestinal o digestivo de dicha plaga y una toxina. El péptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y la toxina puede ser gelonina. Sin embargo, sólo se proporcionan enseñanzas intelectuales, en contraposición con técnicas, para el direccionamiento a roedores.

Existe así una necesidad de nuevos agentes de control de roedores (es decir, agentes que son capaces de controlar una población de roedores, por ejemplo, mediante la muerte de los roedores o mediante la regulación de la capacidad de una población de roedores de reproducirse), que supere algunas de las desventajas que presentan los métodos actuales de control de roedores.

La presente invención aborda esta necesidad proporcionando un agente de control rodenticida que comprende un componente de anticuerpo que se une a un epítipo peptídico específico de roedores (RSPE), en el que dicho RSPE consiste en un fragmento oligopeptídico de una proteína expresada en un roedor, en el que la secuencia del fragmento oligopeptídico representa un epítipo peptídico continuo extracelular que tiene un porcentaje de identidad de 60% o menos con una secuencia peptídica lineal correspondiente de una proteína homóloga de un animal no diana en el que el componente de anticuerpo está unido a un componente tóxico (dicha proteína se refiere en la presente memoria como una proteína diana). Así, en un primer aspecto de la invención se proporciona un agente de control de roedores que comprende un componente de anticuerpo que se une a un epítipo extracelular de una proteína que se expresa en un roedor.

Mediante el direccionamiento del agente de control de roedores a una proteína específica y/o tejido específico en un roedor, por ejemplo a una proteína expresada en el tejido del intestino del roedor/el tracto GI del roedor, el periodo de tiempo en el que el nuevo agente de control de roedores está en contacto con el intestino del roedor se incrementa respecto a los agentes de control de roedores no específicos, que pasan simplemente a través del intestino y no se retrasan a través de una unión específica. Esto, a su vez, puede dar lugar a un incremento eficaz de la potencia del nuevo agente de control de roedores, permitiendo así su uso a concentraciones más bajas que los rodenticidas tradicionales no específicos, tales como los rodenticidas anticoagulantes.

Preferiblemente, el componente de anticuerpo otorga al nuevo agente de control de roedores selectividad para roedores sobre los animales no diana (p. ej. seres humanos, aves, animales de compañía, animales de granja y animales salvajes que no son plagas). Esta selectividad para tejido de roedores/proteínas de roedores sobre las especies no diana es adicionalmente ventajosa ya que probablemente reduzca la necesidad de antidotos y tiene el potencial de reducir el impacto medioambiental del nuevo agente de control de roedores en especies no diana.

Dichos nuevos agentes de control de roedores pueden estar en la forma de una proteína de fusión, en la que el componente tóxico es una proteína o resto peptídico que está unido bien directamente o indirectamente (es decir mediante un conector peptídico) al componente de anticuerpo mediante un enlace peptídico, o en la forma de un conjugado de proteína, en el que el componente tóxico es bien una molécula pequeña (es decir, una entidad química no proteinácea) o proteína o resto peptídico que está conjugado químicamente de manera directa al componente de anticuerpo.

Cuando el componente de anticuerpo reconoce una proteína diana que realiza una función esencial en el roedor (por ejemplo, una proteína que realiza una función esencial en el tracto GI de un roedor), el componente de anticuerpo puede conseguir la función de control del roedor como el único agente funcional.

Dicho agente de control de roedores mediaría su efecto mediante la unión del componente de anticuerpo a la proteína diana esencial bloqueando o inhibiendo así la función de la proteína esencial. Así, en una realización adicional, la presente invención proporciona un agente de control de roedores que comprende un componente de anticuerpo que se une a un epítipo extracelular de una proteína que se expresa en un roedor, en la que la proteína realiza una función esencial en el roedor. Los ejemplos de proteínas diana adecuadas frente a las que se unen los componentes de anticuerpo según este aspecto de la invención (y así que pueden usarse para producir los componentes de anticuerpo según este aspecto de la invención) incluyen un producto génico Sox 10 de roedor, un receptor de entotelina B de roedor (EDNRB), un ligando endotelina-3 de roedor (EDN3), un CFTR de roedor (véase la Tabla 1 a continuación y los Ejemplos para más detalle), IL-2 de roedor, IL-10 de roedor, cadenas alfa y/o beta del receptor de células T de roedor, componentes de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad de roedor. El experto en la técnica apreciará que algunos de los productos génicos/proteínas mencionados anteriormente no son accesibles fácilmente en una superficie epitelial de un roedor y requieren así la internalización antes de que sean capaces de mediar su actividad. En dicho caso, puede ser deseable combinar un componente de anticuerpo dirigido a una de las proteínas anteriores con un componente de anticuerpo de direccionamiento adicional, que incremente la probabilidad de internalización. Así, pueden unirse dos o más componentes de anticuerpo, uno dirigido frente a una de las proteínas mencionadas anteriormente y un segundo que actúa como anticuerpo de direccionamiento a una diana epitelial adecuada para incrementar la internalización, bien mediante conjugación o mediante una proteína de fusión como se describe posteriormente en la presente memoria.

El término "componente de anticuerpo" se usa en la presente memoria para significar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de éste, que se une a un epítipo extracelular de una proteína que se expresa en un roedor. Preferiblemente, el epítipo al que se une el componente de anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que sólo se encuentra en una proteína de roedor, es decir, el anticuerpo se une a un epítipo específico de roedor o RSE. Los epítipos específicos de roedor (RSE), que pueden usarse en la generación de los componentes de anticuerpo para usarse en los agentes de control de roedores de la invención y a los que se une el agente de control de roedores de la invención, forman un segundo aspecto de la invención descrito en la presente memoria. Los componentes de anticuerpo que se unen a RSE se consideran como un tercer aspecto de la invención descrito en la presente memoria.

El RSE será extracelular para facilitar el acceso del anticuerpo (o fragmento de unión al antígeno) a su sitio de unión.

Preferiblemente, la proteína diana que proporciona el RSE se expresará sobre o en una superficie epitelial del roedor, incluyendo, por ejemplo, el epitelio de la nariz, boca, ojos, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario y epidermis. Lo más preferiblemente, la proteína se expresará en (o sobre) el epitelio gastrointestinal de un roedor.

En una realización, el RSE se proporcionará por una secuencia peptídica continua (es decir, secuencial) (es decir, el primer resto de aminoácido del epítipo estará unido directamente mediante un enlace peptídico al segundo resto de aminoácido del epítipo, el segundo resto de aminoácido del epítipo estará unido mediante un enlace peptídico al tercer resto de aminoácido, etc.). Dicho epítipo peptídico continuo se refiere en la presente memoria como un epítipo peptídico específico de roedor o RSPE. Los RSPE a los que se unen los componentes de anticuerpo de la invención, y que pueden ser así usados para generar los componentes de anticuerpo (y también los agentes de control de roedores) de la invención, pueden determinarse por análisis bioinformático comparativo de proteínas que se expresan en la capa de tejido/célula diana deseada como se indica por la información de la bibliografía y las bases de datos, seguido de análisis inmunológicos de confirmación. Los RSPE, como los RSE, se encuentran en la naturaleza sólo en las proteínas de roedores. Un RSPE se define en la presente memoria como un fragmento oligopeptídico de una proteína diana, en el que la secuencia del oligopéptido representa un epítipo peptídico extracelular continuo que tiene un porcentaje de identidad de 60% o menos con una secuencia peptídica lineal correspondiente de una proteína homóloga de un animal no diana (es decir, no roedor, por ejemplo, humano).

El término "fragmento oligopeptídico" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un fragmento de una proteína diana, consistiendo dicho fragmento en al menos aproximadamente 4 y como máximo aproximadamente 50 aminoácidos. Preferiblemente, dicho fragmento oligopeptídico tendrá una longitud entre 9 y 45 (inclusive) aminoácidos y más preferiblemente dicho fragmento oligopeptídico tendrá una longitud entre 9 a 30 (inclusive) aminoácidos. En realizaciones específicas, dicho fragmento oligopeptídico tendrá una longitud de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 24 ó 44 aminoácidos.

Preferiblemente, el porcentaje de identidad entre el RSPE y la proteína no diana será tal que un componente de anticuerpo de la invención tenga una especificidad y afinidad alta para el RSPE y no reaccionará de manera cruzada con una proteína que no sea de roedor de la misma clase/familia como de la que se obtuvo el RSPE. En realizaciones preferidas, el porcentaje de identidad entre el RSPE y la proteína no diana, y en particular entre el RSPE y una secuencia peptídica lineal correspondiente (es decir, continua o secuencial) de una proteína homóloga de un animal no diana, es menor de o igual a 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, ó 25%.

Preferiblemente, los RSPE estarán altamente conservados entre todas las especies de roedores diana, en particular altamente conservados entre ratas y ratones, especialmente entre dos o más de *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y

Mus musculus/Mus domesticus. Por altamente conservados se quiere decir que el porcentaje de identidad entre un RSPE de una especie de roedor y el RSPE correspondiente de una segunda especie de roedor será alto. Preferiblemente, el porcentaje de identidad entre dos RSPE de roedor será al menos 75%. Más preferiblemente, el porcentaje de identidad será mayor de o igual a 80%, 85%, 90% ó 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99%. Los más preferiblemente, el RSPE será idéntico en un 100% entre dos o más especies de roedores.

Aunque se prefiere que el porcentaje de identidad de un RSPE esté altamente conservado entre dos o más especies como se ha discutido anteriormente, si no se observa el alto nivel de conservación deseado, pueden usarse diferentes RPSE de proteínas (bien homólogas o diferentes) de dos o más especies de roedores, para generar diferentes componentes de anticuerpo, que pueden combinarse entonces en un agente de control de roedores como se describe posteriormente en la presente memoria (p. ej. cada componente de anticuerpo unido a un componente tóxico comprendiendo así el agente de control de roedores múltiples moléculas diferentes anticuerpo-toxina o comprendiendo el agente de control de roedores un componente tóxico unido a dos o más componentes de anticuerpo diferentes, reconociendo cada uno de los dos o más componentes de anticuerpo un RSPE de una proteína de una especie de roedor diferente). En una realización específica, un componente de anticuerpo que reconoce MDR1 de ratón (SEQ ID NO: 8) podría combinarse con un componente de anticuerpo que reconoce MDR1 de rata (SEQ ID NO: 9), en agentes de control de roedores de la invención.

Los ejemplos de proteínas diana a las que se unen los componentes de anticuerpo de la invención, y que pueden usarse para producir o identificar los componentes de anticuerpo de la invención, se proporcionan en la Tabla 1. Esta Tabla también proporciona ejemplos de RSPE específicos que pueden obtenerse de las proteínas ejemplificadas. El experto en la técnica apreciará que ni la lista de proteínas proporcionada en la Tabla 1, ni la lista de RSPE obtenidos de éstas, es exhaustiva. Pueden identificarse RSPE adecuados adicionales en las proteínas proporcionadas (todas ellas se expresan en el tracto GI), y también pueden usarse proteínas adicionales, por ejemplo de otros tejidos diana de roedores tal como el epitelio nasal, epitelio bucal, epidermis, epitelio del tracto genitourinario y epitelio del ojo, para producir los componentes de anticuerpo de la invención.

Tabla 1 Ejemplos de Proteínas a las que pueden dirigirse los anticuerpos de la presente invención y ejemplos específicos de RSPE que pueden obtenerse de dichas proteínas.

Proteína Fuente	SwissProt/ GenPept Número de Registro	Secuencia primaria de aminoácidos del RSPE	SEQ ID NO
Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata	P51574	VIRSRASDGCLEVKE	SEQ ID NO: 1
Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata	P51574	CSSDFKSSNLD	SEQ ID NO: 2
CD 155 de rata (PVR, Tage4)	Q9R1E1	SNVNGSYREMKETGS OP	SEQ ID NO: 3
Transportador de glucosa GTR2 (GLUT2) de rata	P12336	GTDTPLIVTPAHTTP	SEQ ID NO: 4
Transportador de cloro CFTR de rata	P34158	LKNNPVNGGNGTKI A	SEQ ID NO: 5
Transportador de nucleósidos CNT2 de rata	Q62773/ Q9QWI3	WQDKES SLRNL AK	SEQ ID NO: 6
Transportador de aminoácidos colónico CATB(0+) (slc6a14) de rata	XP233305	GGDMFMNISWVN	SEQ ID NO: 7
Transportador de aminoácidos colónico CATB(0+) (slc6a14) de rata	XP233305	DTGGDMFMNISWVN S	SEQ ID NO: 36

Proteína Fuente	SwissProt/ GenPept Número de Registro	Secuencia primaria de aminoácidos del RSPE	SEQ ID NO
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de rata	P43245	SFTPSRDPHSDRAIT	SEQ ID NO: 8
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de ratón	P06795	SFTKAEASILPSIT	SEQ ID NO: 9
Sacarasa-Isomaltasa de rata	P23739	YNAESITNENAGLKA TL	SEQ ID NO: 10
Transportador de glucosa GLUT7 de ratón	XP487836	NTPHKVLKSFYN	SEQ ID NO: 11
Transportadores de glucosa GLUT7 de ratón/GTR5 (GLUT5) de rata	XP4878361 P43427	YYDRNKENIES	SEQ ID NO: 12
Transportador de sodio/fosfato Npt2a (Slc34a1) de rata	Q06496	PETKEASTSMSRVEA	SEQ ID NO: 13
Polipéptido de transporte de aniones orgánicos OATP-B (SLC21A9) de rata	Q9JHI3	LGAQPGPSLFPGCSEP CSCQSDDF	SEQ ID NO: 14
Polipéptido de transporte de aniones orgánicos OATP-B (SLC21A9) de rata	Q9JHI3	QPGPSLFPGCSEPCSC Q	SEQ ID NO: 15
Transportador biliar apical dependiente de sodio ASBT de rata	Q62633	DAEFLEKTDNDMD	SEQ ID NO: 16
Transportador de calcio CaTi (ECAC2) de rata	Q9R186	QAFQQQDDLYSE	SEQ ID NO: 17
Polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP3 de rata	088397/ Q9EQR8	SYKGVQHQLHVESKV L	SEQ ID NO: 18
Transportador de esteroi ABCG8 de rata	P58428/ Q8CIQ5/ Q923R7	QIQFNNGHIYTTQIG	SEQ ID NO: 19
Transportador de glucosa GTR8 (GLUT8) de rata	Q9JJZ1/ Q9JMA6	HVGLLVPISAEPADV HLG	SEQ ID NO: 20
Proteína asociada con la resistencia a múltiples fármacos MRP1/transportador ABC de rata	Q810E4/ Q8CG09/ Q810G9	MFAGPEILELIINF	SEQ ID NO: 21

Proteína Fuente	SwissProt/ GenPept Número de Registro	Secuencia primaria de aminoácidos del RSPE	SEQ ID NO
Cotransportador sodio-nucleósido CNT1 de rata	Q62674	HSHTMLPEGEGLNK A	SEQ ID NO: 22
Transportador de urea UT-B de rata	P70633/ P97689	PSKLFMPVSSVP	SEQ ID NO: 23
Intercambiador cloruro/aniones DRA1 de rata	Q924C9	LSSSSAENDSMIEEKV MV	SEQ ID NO: 24
Transportador de nucleósidos equilibrativo ENT1 de ratón	Q9JIM1/ Q99K.84/ Q9DBT8/ Q9JHF0	KARHCGAQRHHFVF KH	SEQ ID NO: 25
Transportador de nucleósidos equilibrativo ENT1 de rata	054698	TNQSCESTEALADPSV SL	SEQ ID NO: 26
GCC (guanilil ciclase) de rata	P23897	VSGRFPSERS	SEQ ID NO: 27
PLB (fosfolipasa B) de rata	054728	AEDLWIQAKELVRHL KDNP	SEQ ID NO: 28
LPH (lactasa-florizina hidrolasa) de rata	Q02401/ Q63712/ Q63719	EDAAPTASPVQS	SEQ ID NO: 29
LPH (lactasa-florizina hidrolasa) de ratón	XP129479	RYVQVCALCRFSTVF SPRLPEPVKGERRFSH ISLNQDLPRPLFP	SEQ ID NO 30
AMPN (aminopeptidasa N) de rata	PI 5684/ Q9JHP4	GSTSATTSTNPA	SEQ ID NO: 31
MCDL (mucina y proteína semejante a cadherina) de rata	Q9JIK1	NKDILLTTVPMETERT IR	SEQ ID NO: 32
SCAB (subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida) de rata	P37090/ 009183	LPQDLVGMGYAPDRI	SEQ ID NO: 33
SCAB (subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida) de rata	P37090/ 009183	SSNPAPGST	SEQ ID NO: 34
KCV2 (canal de potasio abierto por voltaje subfamilia V miembro 2) de rata	XP220024	DQRHKGKSPREHDLE	SEQ ID NO: 35

Los ejemplos de proteínas diana preferidas para usarse en la invención son el transportador de oligopéptidos PepT1 de rata, CD155 de rata, GTR2 de rata, CFTR de rata, CNT2 de rata, CATB(0)+ de rata, MDR1 de rata, MDR1 de ratón, sacarasa-isomaltasa de rata, GLUT7 de ratón, OATP-B de rata, ENT1 de rata, GCC de rata, PLB de rata, LPH de rata, AMPN de rata, MCDL de rata, y SCAB de rata.

Los RSPE preferidos de la invención tienen las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 26, 27, 28, 29, 31, 32 y 34.

Las proteínas diana particularmente preferidas para usarse en la invención son el transportador de oligopéptidos PepT1 de rata, CD 155 de rata, CFTR de rata, CNT2 de rata, GLUT7 de ratón, GCC de rata, PLB de rata y LPH de rata.

Los RSPE particularmente preferidos de la invención tienen las SEQ ID NOs 1, 3, 5, 6, 11, y 27, 28 y 29.

El experto en la técnica apreciará que los anticuerpos reconocen la estructura terciaria de las proteínas y que un epítipo puede comprender restos de aminoácidos que están distribuidos a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de una proteína aunque sean estructuralmente muy parecidos entre sí. Así, en una realización adicional los componentes de anticuerpo (y así también los agentes de control de roedores) de la invención pueden reconocer un RSE discontinuo extracelular.

Los anticuerpos para usarse en la invención pueden ser policlonales o monoclonales. Dichos anticuerpos pueden obtenerse inmunizando un animal con un RSPE como se ha descrito anteriormente, o inmunizando un animal con la proteína diana del roedor intacta.

Los anticuerpos policlonales de la invención pueden obtenerse a partir del suero de dicho animal inmunizado, véase por ejemplo, el Ejemplo 2. Los anticuerpos policlonales que reconocen el RSPE o la proteína diana de roedores pero que no reconocen una proteína homóloga de un animal no diana pueden identificarse usando técnicas inmunológicas estándar (por ejemplo, por ELISA, y/o mediante inmunohistoquímica frente a fuentes de tejido apropiadas).

Los anticuerpos monoclonales para usarse en la invención pueden obtenerse aislando linfocitos B del bazo de un animal inmunizado con un RSPE o proteína diana de roedores y preparando una línea celular de hibridoma con dichos linfocitos. Las líneas celulares de hibridoma se criban entonces para encontrar aquellas que secretan anticuerpos que reconocen el RSPE o la proteína diana de roedores pero que no reconocen una proteína homóloga de un animal no diana, véase, por ejemplo, los Ejemplos.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales preferidos para usarse en la invención se describen en la presente memoria en los Ejemplos.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno para usarse en la invención también pueden aislarse a partir de una biblioteca de exposición en bacteriófagos (sin estimular, o inmune) de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, o a partir de una biblioteca de exposición de levaduras o bacteriana similar de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno. Típicamente, dichas bibliotecas de exposición se criban para identificar proteínas expuestas que se unen a RSPE o proteínas diana de roedores. El experto en la técnica estará familiarizado con la metodología para cribar dichas bibliotecas, identificar parejas de unión en la biblioteca y posteriormente aislar dichos miembros. Las bibliotecas de exposición de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que pueden usarse para el cribado y su construcción están descritas en la técnica (véanse, por ejemplo: Publicaciones de Patente Internacional Nos WO 01/90190 y WO 93/19172; Patentes de EEUU Nos 5.759.808 y 6.517.829; revisado por Hoogenboom 1997, Trends in Biotechnology 15(2):62-70; Dooley *et al.*, 2003 Molecular Immunology 40: 25-33; Nutall *et al.*, 2001 Molecular Immunology 2001, 38:313-326; y Hanes *et al.*, 1998 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95: 14130-14135). De nuevo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno identificados de esta manera se evaluarán para confirmar que no se unen a una proteína homóloga de un animal no diana.

Los anticuerpos para usarse en la invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, p. ej., pueden ser un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención será un anticuerpo IgG. Los anticuerpos de la invención pueden ser moléculas de inmunoglobulina que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras o pueden ser anticuerpos de cadena única.

El término "anticuerpo de cadena única" tal y como se usa en la presente memoria engloba tanto anticuerpos naturales que consisten sólo en un único tipo de cadena, p. ej., anticuerpos obtenidos de Camélido o Chondrichthyes (tiburón), que carecen de cadenas ligeras, así como anticuerpos obtenidos por ingeniería que consisten sólo en una única cadena polipeptídica. Los ejemplos de dichos anticuerpos obtenidos por ingeniería incluyen, por ejemplo, anticuerpos de cadena única o "monovalentes" como se describe en la Publicación de Patente Internacional No. WO94/09817 y fragmentos variables de cadena única (scFv). Los anticuerpos de la invención son preferiblemente anticuerpos de cadena única. En una realización preferida, el anticuerpo es un scFv. En otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena única que carece de cadenas ligeras, lo más preferiblemente un anticuerpo obtenido de Camélidos (por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente Internacional No. WO 94/04678).

Los fragmentos de unión al antígeno para usarse en la invención incluyen cadenas ligeras de inmunoglobulinas, cadenas pesadas de inmunoglobulinas, dominios V_H , dominios V_L , Fvs, Fabs, di-Fabs, Fab's, $F(ab')_2$ s, dominios V_{HH} , dominios IgNAR V y CDR. El experto en la técnica estará familiarizado con los fragmentos de unión al antígeno tales como cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas, dominios V_H y V_L , Fvs, Fabs, di-Fabs, Fab's, $F(ab')_2$ s, y CDR, y su preparación. Un dominio V_{HH} es el dominio variable de un anticuerpo de Camélido. Los dominios V_{HH} y su aislamiento están descritos en la técnica, véanse por ejemplo la Publicación de Patente Internacional No. WO 94/04678, Publicación de Patente Internacional No. WO 01/90190 y las referencias contenidas en ellas. Los anticuerpos IgNAR son anticuerpos de cadena única de tiburones, que, como los anticuerpos de Camélidos, carecen de cadenas ligeras (véase Greenberg *et al.*, 1995 Nature 374:168-173). La región de unión al antígeno de estos anticuerpos, el dominio variable de IgNAR (dominio IgNAR V), también se ha descrito en la técnica, véase por ejemplo Dooley *et al.*, 2003 (Molecular Immunology 40:25-33) y las referencias citadas en él. En algunas realizaciones, el componente de anticuerpo para usarse en la invención será un anticuerpo de Camélido o un dominio V_{HH} , que reconoce una de las proteínas diana preferidas descritas anteriormente en la presente memoria. En particular, se prefieren los anticuerpos de Camélidos o dominios V_{HH} que se unen a una cualquiera de las SEQ ID NOs 1, 3, 5, 6, 11, ó 27, mientras que se prefieren particularmente los dominios V_{HH} que se unen a una cualquiera de las SEQ ID NOs 5, 6, 11 ó 27.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno usados en la invención también pueden obtenerse por ingeniería para incrementar su estabilidad, por ejemplo pueden estabilizarse por puentes disulfuro (véase por ejemplo Reiter *et al.*, 1996, Nature Biotechnology 14(10): 1239-1245).

Como se ha descrito anteriormente, los componentes de anticuerpo pueden obtenerse usando proteínas de roedor intactas o RSE (término que incluye los RSPE), bien como antígenos o para cribar anticuerpos/fragmentos de unión al antígeno adecuados, que se han seleccionado porque tienen un bajo porcentaje de identidad con proteínas homólogas de animales no diana (es decir, no roedores, por ejemplo, seres humanos). Se reduce así la probabilidad de que un componente de anticuerpo de la presente invención reaccione de manera cruzada con una proteína homóloga de una especie no diana. Así, en realizaciones preferidas de la invención, los componentes de anticuerpo (y así también los agentes de control de roedores de la invención) presentan selectividad para un epítipo en una proteína diana de roedor en lugar del epítipo correspondiente en una proteína homóloga de un animal no diana. En otras palabras, los componentes de anticuerpo preferidos de la invención muestran selectividad para un RSE mediante la unión a él (o a la proteína de roedor de la que se obtiene el RSE) con una mayor afinidad que a un epítipo correspondiente en una proteína homóloga (o la proteína homóloga) de un animal no diana. Los animales no diana incluyen seres humanos, aves, animales de compañía, animales de granja y animales salvajes que no son plagas.

Preferiblemente los componentes de anticuerpo de la invención presentarán una unión reducida, e incluso más preferiblemente no se unirán, a proteínas homólogas de seres humanos. Aún más preferiblemente los componentes de anticuerpo de la invención no sólo presentarán una unión reducida (o no se unirán) a proteínas homólogas de seres humanos, sino que también presentarán una unión reducida (o no se unirán) a proteínas homólogas de al menos otro animal no diana.

Para evitar dudas, el término "unir" en la medida en la que se usa en la presente memoria es para describir la interacción de un componente de anticuerpo de la invención con un epítipo o proteína de una manera cualitativa o cuantitativa.

Cuando el término se usa cualitativamente, la especificidad de la unión a una proteína diana, RSE o RSPE puede demostrarse por la capacidad del componente de anticuerpo de unirse a la proteína diana, RSE, o RSPE de una manera desplazable, en la que el desplazamiento de la unión del anticuerpo resulta de la presencia del antígeno frente al que se produjo o cribó el componente de anticuerpo (referido de aquí en adelante en la presente memoria como el "antígeno específico"). Si no se observa la unión de dicha proteína diana/RSE/RSPE-componente de anticuerpo específico a una proteína no diana (o un epítipo correspondiente de una proteína no diana), o si se observa alguna unión a una proteína no diana (o epítipo correspondiente de una proteína no diana) que no es desplazable por el antígeno específico, se considerará que el componente de anticuerpo muestra selectividad para la proteína diana, RSE o RSPE (según sea apropiado) ya que el componente de anticuerpo se une a la proteína diana/RSE/RSPE con una mayor afinidad que a una proteína no diana o epítipo correspondiente de una proteína no diana.

La especificidad y selectividad pueden determinarse así mediante análisis inmunohistoquímico de muestras de tejido apropiadas y/o mediante ELISA con muestras apropiadas.

Cuando el término "unir" se usa cuantitativamente, esto significa que el componente de anticuerpo tiene una afinidad de al menos 10^{-6} M para el epítipo o proteína con el que interacciona. Preferiblemente, la afinidad será al menos 10^{-7} M, más preferiblemente 10^{-8} M, más preferiblemente 10^{-9} M, aún más preferiblemente 10^{-10} M y lo más preferiblemente 10^{-11} M o mayor. Así, cuando un componente de anticuerpo se une a un RSE o RSPE (o la proteína de la que se obtiene el RSE o RSPE) tendrá una afinidad de al menos 10^{-6} M, y en realizaciones adicionales tendrá

una afinidad de al menos 10^{-7} M, al menos 10^{-8} M, al menos 10^{-9} M y al menos 10^{-10} M. En realizaciones preferidas, el componente de anticuerpo no se unirá a un epítipo correspondiente en una proteína homóloga de una o más especies no diana (preferiblemente humana) es decir la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será menos de 10^{-6} M, o presentará una unión reducida a ésta es decir la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será al menos 10 veces menor que para la proteína diana de roedor. Así, en realizaciones preferidas, cuando un componente de anticuerpo de la invención tiene una afinidad de al menos 10^{-6} M para un RSE o RSPE (o la proteína de la que se obtiene el RSE o RSPE), la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será menor de 10^{-6} M, y preferiblemente 10^{-5} M o menor; cuando un componente de anticuerpo de la invención tiene una afinidad de al menos 10^{-7} M para un RSE o RSPE (o la proteína de la que se obtiene el RSE o RSPE), la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será 10^{-6} M o menor; cuando un componente de anticuerpo de la invención tiene una afinidad de al menos 10^{-8} M para un RSE o RSPE (o la proteína de la que se obtiene el RSE o RSPE), la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será 10^{-7} M o menor y preferiblemente 10^{-6} M o menor; cuando un componente de anticuerpo de la invención tiene una afinidad de al menos 10^{-9} M para un RSE o RSPE (o la proteína de la que se obtiene el RSE o RSPE), la afinidad del componente de anticuerpo para una proteína homóloga de una especie no diana será 10^{-8} M o menor y preferiblemente 10^{-6} M o menor.

La afinidad del componente de anticuerpo para proteínas diana y no diana (así como para los epítopos de éstas) puede determinarse usando cualquier técnica apropiada; por ejemplo, mediante el uso de resonancia de plasmón superficial (p. ej. con BIAcore™).

En una realización de la presente invención, el agente de control de roedores está en la forma de una proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende un primer componente de proteína y un segundo componente de proteína, dicho primer componente de proteína es un componente de anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y dicho segundo componente de proteína se selecciona del grupo que consiste en una toxina, un inmunógeno y una hormona.

El primer componente de proteína puede estar unido directamente al segundo componente de proteína, sin embargo, se prefiere que los dos componentes estén unidos indirectamente mediante un péptido conector. El péptido conector tendrá en general una longitud que sea suficiente para que el primer componente y el segundo componente funcionen según se desea sin que un componente afecte de manera adversa la función del otro (por ejemplo, por impedimento estérico). Un ejemplo de un péptido conector usado comúnmente, adecuado para usarse en este aspecto de la invención, es el conector (Gly4Ser)_n, en el que "n" es un número entero mayor de o igual a 1. Típicamente, n es mayor de o igual a 3. Preferiblemente, la secuencia primaria del péptido conector se diseña para ser estable en entornos hidrolíticos y termales exigentes. Esto puede conseguirse eliminando o mutando restos en el conector que actúan como sitios de reconocimiento para el procesamiento del conector a través, por ejemplo, de un mecanismo proteolítico. Los ejemplos adicionales de péptidos conectores adecuados son los descritos por Gustavsson *et al*, 2001 (Protein Engineering 14:711-715), Hennecke *et al.*, 1998 (Protein Engineering 11:405-410) y Huston *et al*, 1991 (Methods in Enzymology 203:46-88).

En una realización adicional, es deseable obtener por ingeniería una inestabilidad específica en el péptido conector de manera que se realice la separación controlada de los dos componentes de proteína/liberación del segundo componente de proteína después de la administración de la proteína de fusión a un locus apropiado, p. ej. una vez que la proteína de fusión se ha internalizado el segundo componente de proteína puede liberarse intracelularmente. El control de la separación descrito puede servir para incrementar la actividad de determinadas proteínas de fusión.

Como se ha mencionado anteriormente, en una realización de la proteína de fusión, el segundo componente de proteína es una toxina. La toxina otorga a la proteína de fusión una actividad rodenticida: proporciona toxicidad frente a una célula diana de roedor mediante un modo de acción mediado de forma externa o interna. Las toxinas adecuadas para usarse en este aspecto de la invención incluyen entre otras proteínas que desorganizan las membranas, ribosiltransferasas, serina proteasas, activadores de la guanilil ciclasa, proteínas implicadas en el transporte de iones mediado por ATP-asa, adenilil ciclasas mediadas por calmodulina, ARN glicosidasas y ribonucleasas. Los ejemplos específicos de toxinas adecuadas se proporcionan a continuación en la Tabla 2.

El experto en la técnica apreciará que algunas de las toxinas listadas en la Tabla 2 son representativas de una familia de moléculas de toxina y cuando éste es el caso uno cualquiera de esos miembros también puede usarse en la invención.

Tabla 2 Ejemplos de proteínas que pueden usarse como toxinas en las proteínas de fusión de la invención.

Proteína	Modo de Acción	SwissProt/ UniProt Número de Registro	EMBL No de Registro
Perfringolisina O (toxina theta)	citolisina formadora de poros dependiente de colesterol	PI9995	M81080
Hemolisina alfa (Hla)	citolisina formadora de poros	P09616	X01645
Esfingomielinasa (toxina beta)	fosfolipasa C/ desorganización de la membrana	P09978	X61716
Hemolisina delta	péptido lítico formador de poros anfipático catiónico	P01506	AF230358
Granzima B	serina proteasa/ inductora de la apoptosis	P04187/ P18291	X04072/ M34097
Toxina alfa	fosfolipasa C/ desorganización de la membrana	P15310	XI7300
Toxina Cyt p. ej. Cyt 2a	formadora de poros/desorganización de la membrana	Q04470	Z14147
Toxina de la difteria	NAD(+)-difamida ADP-ribosiltransferasa	P00588	X00703
Granulisina	formadora de poros/desorganización de la membrana	P22749	X54101
Melitina	péptido lítico formador de poros anfipático catiónico	P01501	X02007
Perforina	Citolisina formadora de poros con unión a calcio	PI4222	M31951
Enterotoxina del cólera	NAD(+) ADP-ribosiltransferasa	P01555/ P01556	X00171
Enterotoxina estable con calor	activador de la guanilil ciclasa	Q47185	MI 8345
Equinatoxina	citolisina formadora de poros	P61914	U41661
Listeriolisina	citolisina formadora de poros dependiente de colesterol	P13128	X15127
VIP2	NAD(+) ADP-ribosiltransferasa	Q844J9	AY245547
Enterotoxina auxiliar	Transporte de iones mediado por ATPasa	P38441	Z22569
Aerolisina	citolisina formadora de poros dependiente de colesterol	P09167	MI 6495
BinA/BinB	citolisinas formadoras de poros	P06575/ PI0565	Y00378/ X07992
Colicina EI	despolarización transmembrana	P02978	J01563
Hemolisina A	citolisina formadora de poros	P08715	M14107
CTXIV	inhibidor de la proteína quinasa C	P01443	Y12491

Proteína	Modo de Acción	SwissProt/ UniProt Número de Registro	EMBL No de Registro
Proteínas inactivadoras de ribosoma de tipo 2, p. ej. Ricina	rARN N-glicosidasa	P02879	X03179
Amebaporo	péptido formador de poros	P34095	M83945
Hemolisina El Tor	citolisina formadora de poros/desorganización de la membrana	P09545	Y00557
Hemolisina de <i>Vibrio damsela</i>	fosfolipasa D/ desorganización de la membrana	Q60079	L16584
Pneumolisina	citolisina formadora de poros dependiente de colesterol	PI 1990	X52474
Estreptolisina O	citolisina formadora de poros dependiente de colesterol	P21131	M18638
Hemolisina directa termoestable (toxina de Kanagawa)	citolisina formadora de poros	PI9249	D90101
Hemolisina de <i>Leptospira</i>	formadora de poros/desorganización de la membrana	034095	U89708
Toxina Cry p. ej. Cry 1 Ac	citolisina formadora de poros	P05068	MI 1068
Toxina del ántrax	ataque proteolítico de quinasas en células diana/ adenilil ciclasa dependiente de calmodulina	P15917/ PI3423/ P40136	M29081/ M22589/ M23179
Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>	ADP-ribosiltransferasa dependiente de NAD	PI 1439	KOI397
Barnasa	ribonucleasa	P00648	MI 4442
VIP3	citolisina formadora de poros	Q45792	L48811
Tionina	Toxina de plantas citolítica	P01543	AF004018
Proteínas inactivadoras de ribosoma de tipo 1 p. ej. Gelonina	rARN N-glicosidasa	P33186	LI 2243
Beta-purotionina	Toxina de plantas citolítica	P01543	AF004018

Las toxinas preferidas para usarse en realizaciones de la invención incluyen granzima B, cyt 2A, β -purotionina, VIP2A, gelonina, y granulicina. Las toxinas particularmente preferidas se seleccionan del grupo que consiste en granzima B, cyt2A, β -purotionina, VIP2A y gelonina.

Las toxinas proteicas como se ha descrito anteriormente, pueden incorporarse en su totalidad en proteínas de fusión de la invención. Alternativamente, cuando un dominio o fragmento de dicha toxina otorga la actividad tóxica, ese dominio o fragmento puede emplearse como el segundo componente de proteína en la proteína de fusión. La presente solicitud también describe un rodenticida en el que el segundo componente de proteína en una proteína de fusión es un inmunógeno, es decir, un poli u oligopéptido que es capaz de incitar una respuesta inmune en roedores. Preferiblemente, las proteínas de fusión con inmunógeno descritas serán capaces de actuar como immunocontraceptivos y actuarán así como agentes de control de roedores impidiendo la reproducción. Los

antígenos específicos del esperma o del óvulo, tales como por ejemplo, lactato deshidrogenasa C, el antígeno de esperma PH-20 (Primakoff *et al*, 1988 Nature 335:543-6), fertilina (PH-30) y antígenos de la zona pelúcida son así inmunógenos adecuados para usarse como el segundo componente de proteína en las proteínas de fusión.

La presente solicitud también describe que el segundo componente de proteína en una proteína de fusión de la invención es una hormona o mimético de hormona proteínico. En esta descripción, el segundo componente de proteína interferirá con e impedirá la reproducción de los roedores y la proteína de fusión actúa así como un agente de control de roedores impidiendo la reproducción. Un ejemplo de una hormona que puede usarse en esta descripción de la invención incluye la hormona liberadora de gonadotropina.

En realizaciones adicionales, las proteínas de fusión como se han descrito anteriormente pueden comprender al menos un componente de proteína adicional. Este componente (o componentes) de proteína adicional puede ser una toxina, como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con esto, puede construirse una proteína de fusión que comprende un componente de anticuerpo y al menos dos componentes de proteína adicionales, en el que cada uno de los componentes de proteína adicionales otorga una función de control de roedores (es decir tóxica) a la proteína de fusión. El segundo y adicional componente o componentes de proteína pueden tener cada uno las mismas funciones de control de roedores (es decir, pueden ser tóxicos independientemente) y cuando tienen la misma función cada uno puede tener el mismo, o diferente independientemente, modo de acción. Cuando el componente o componentes de proteína adicionales tienen la misma función de control de roedores y en el que al menos un componente de proteína adicional tiene un modo de acción diferente del segundo componente de proteína, la eficacia del agente de control de roedores puede incrementarse (respecto a un agente de control de roedores que comprende un único componente de proteína que otorga actividad de control de roedores).

Por ejemplo, una proteína de fusión en la que el segundo componente de proteína es una toxina que desorganiza la célula (p. ej. se selecciona del grupo que consiste en perfringolisina O, hemolisina alfa, esfingomielinasa, hemolisina delta, toxina alfa, toxina cyt, granulinsina, melitina, perforina, equinatoxina, listeriolisina, aerolisina, hemolisina A, amebaporo, hemolisina El Tor, hemolisina de *Vibrio damsela*, pneumolisina, estreptolisina O, toxina de Kanagawa, hemolisina de leptospira, toxina cry, VIP3, tioxina y purtionina β) y el o los componentes de proteína adicionales pueden ser una toxina que requiera la internalización dentro de una célula para ser activa (p. ej. seleccionada del grupo que consiste en granzima B, toxina de la difteria, endotoxina del cólera, VIP2, enterotoxina auxiliar, colicina El, CTXIV, una proteína inactivadora de ribosoma de tipo 2 tal como ricina, toxina del ántrax, exotoxina A de *Pseudomonas*, barnasa, una proteína inactivadora de ribosoma de tipo 1 tal como gelonina), puede ser un agente de control de roedores particularmente eficaz ya que la actividad de desorganización de membrana otorgada por el segundo componente de proteína puede ayudar a la actividad funcional del componente de proteína adicional facilitando el acceso del componente de proteína adicional al interior de una célula de roedor. En realizaciones preferidas, la proteína de fusión comprenderá al menos un componente de toxina seleccionado del grupo que consiste en: cyt2A, purtionina β y granulinsina; y al menos un componente de toxina seleccionado del grupo que consiste en: granzima B, VIP2A, y gelonina.

Las proteínas de fusión de la invención pueden construirse de manera que el primer componente de proteína (el componente de anticuerpo) sea N terminal respecto al segundo componente de proteína, alternativamente pueden construirse de manera que el segundo componente de proteína sea N terminal respecto al primer componente de proteína. Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones es deseable unir indirectamente los dos componentes de proteína mediante un péptido conector. Así, las proteínas de fusión de la invención pueden comprender desde el extremo N al C terminal, el primer componente de proteína unido mediante un enlace peptídico a un péptido conector, que a su vez está unido mediante un enlace peptídico al segundo componente de proteína o pueden comprender desde el extremo N al C terminal el segundo componente de proteína unido mediante un enlace peptídico a un péptido conector, que a su vez está unido mediante un enlace peptídico al primer componente de proteína.

Cuando la proteína de fusión comprende un componente de proteína adicional éste puede ser N terminal respecto al primer componente es decir el componente de proteína adicional está unido bien directamente a través de su resto C terminal mediante un enlace peptídico al resto N terminal del primer componente de proteína o indirectamente mediante un péptido conector (o un componente de proteína adicional) al resto N terminal del primer componente de proteína.

En una realización adicional, el componente de proteína adicional es N terminal respecto al segundo componente de proteína es decir el componente de proteína adicional está unido bien directamente a través de su resto C terminal mediante un enlace peptídico al resto N terminal del segundo componente de proteína o indirectamente mediante un péptido conector (o un componente de proteína adicional) al resto N terminal del segundo componente de proteína. En más realizaciones adicionales, el componente de proteína adicional puede ser i) C terminal respecto al primer componente es decir el componente de proteína adicional está unido bien directamente a través de su resto N terminal mediante un enlace peptídico al resto C terminal del primer componente de proteína o indirectamente mediante un péptido conector (o un componente de proteína adicional) al resto C terminal del primer componente de proteína; o ii) C terminal respecto al segundo componente de proteína es decir el componente de proteína adicional

está unido bien directamente a través de su resto N terminal mediante un enlace peptídico al resto C terminal del segundo componente de proteína o indirectamente mediante un péptido conector (o un componente de proteína adicional) al resto C terminal del segundo componente de proteína.

Los componentes de anticuerpo y/o proteínas de fusión de la invención pueden producirse expresando los ácidos nucleicos que los codifican en cualquier sistema de expresión de proteínas adecuado. Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión de la invención pueden obtenerse clonando un ácido nucleico que codifica el primer componente de proteína en marco con un ácido nucleico que codifica el segundo componente de proteína. Cuando el primer y segundo componentes de proteína están unidos indirectamente mediante un conector peptídico, un ácido nucleico que codifica el conector separará y estará en marco con los dos componentes de proteína de la proteína de fusión.

Los ácidos nucleicos que codifican componentes de anticuerpo pueden aislarse usando técnicas de biología molecular estándar a partir de células de hibridoma que expresan un anticuerpo de la invención. Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican componentes de anticuerpo pueden obtenerse, de nuevo usando técnicas de biología molecular estándar, a partir de clones de bibliotecas de exposición en fagos u otras bibliotecas que codifican un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

La secuencia de los ácidos nucleicos que codifican los ejemplos del segundo componente de proteína (el componente tóxico) está disponible en la técnica, véanse por ejemplo las referencias de la base de datos EMBL en la Tabla 2.

Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos conectores pueden sintetizarse *de novo*, por ejemplo a partir de oligonucleótidos que codifican la secuencia del péptido conector.

Con el fin de que un componente de anticuerpo o proteína de fusión se exprese en un sistema de expresión de proteínas adecuado, el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se unirá de manera operativa a un promotor adecuado y opcionalmente un terminador de la transcripción adecuado. En general, el promotor al que se une de manera operativa el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión será cualquier promotor capaz de dirigir la expresión de la proteína de fusión en la célula anfitriona en la que se quiere introducir el ácido nucleico. Así, si se desea que el componente de anticuerpo o la proteína de fusión se exprese en una célula bacteriana, el promotor será operativo en esa célula bacteriana. De manera similar, si se desea que el componente de anticuerpo o la proteína de fusión se exprese en un sistema de expresión fúngico el promotor será operativo en una célula fúngica y la misma lógica prevalece si la construcción se quiere introducir en un sistema de expresión de cultivo de células de mamífero o un sistema de expresión de plantas. El uso de un promotor específico de semillas es particularmente deseable cuando el componente de anticuerpo o proteína de fusión se quiere expresar en células de planta y/o plantas. Cuando los ácidos nucleicos de la invención están unidos de manera operativa con una región de terminación de la transcripción adecuada, ésta será una que medie la terminación de la transcripción en la célula anfitriona en la que se quiere expresar el componente de anticuerpo o proteína de fusión. Las regiones de terminación de la transcripción adecuadas para este propósito están descritas en la técnica.

Los sistemas de expresión adecuados para la expresión de los componentes de anticuerpo y/o proteínas de fusión de la invención incluyen sistemas de expresión microbianos tales como sistemas bacterianos (p. ej. sistemas de expresión de *E. coli*, *Bacillus*) y fúngicos p. ej. levaduras (tal como, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, especies de *Pichia*, especies de *Hansenula*), y otros sistemas de expresión fúngicos (p. ej. sistemas de expresión de hongos filamentosos obtenidos de especies de *Aspergillus*, *Trichoderma reesei*, y *Neurospora crassa*); sistemas de expresión de mamíferos p. ej. células CHO y sistemas de expresión de plantas. Las plantas y células de plantas preferidas para usarse en la expresión de las proteínas de fusión de la invención incluyen trigo, cebada, maíz, sorgo, avena, arroz y mijo. El experto en la técnica estará familiarizado con estos sistemas de expresión, que están descritos ampliamente en la técnica.

Los nuevos agentes de control de roedores como se describen en la presente memoria también pueden estar en la forma de un conjugado de proteína. Así, en un aspecto adicional, la invención proporciona un conjugado de proteína que comprende un componente de anticuerpo de la invención como se describe en la presente memoria, conjugado químicamente con un componente tóxico. En una realización, el componente tóxico será una entidad química pequeña, aunque en una realización adicional el componente tóxico será una proteína o péptido como se ha descrito anteriormente en la presente memoria respecto a las proteínas de fusión de la invención.

Cuando el componente tóxico es una entidad química pequeña, los ejemplos de compuestos tóxicos adecuados para usarse en este aspecto de la invención incluyen colchicina; doxorubicina; caliqueamicina; moléculas de la clase de fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID); citocalasina; anticoagulantes tales como brodifacum, difenacum, bromadiolona, flocumafen, difetialona, hidroxycumarinas, indano-dionas; calciferol; brometalina; flupropadina; fosfuro de cinc; escilirósido; (mono)fluoroacetato de sodio; ftuoroacetamida; alfacloalosa; sulfato de talio.

El componente de anticuerpo del conjugado de proteína puede obtenerse como se ha descrito anteriormente y puede conjugarse químicamente directamente con el componente tóxico. Típicamente, esta conjugación implicará el uso de agentes heterobifuncionales que resultan en uniones disulfuro o tioéter como está descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T. "Bioconjugate Techniques" Academic Press, Londres, 1996, para metodologías estándar respecto al uso de reactivos de entrecruzamiento).

En una realización adicional en la que el componente tóxico es una entidad química pequeña, el compuesto tóxico puede encapsularse y la cápsula se unirá a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención.

En una realización particular, la cápsula puede unirse mediante conjugación química como se ha discutido anteriormente. En otra realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención puede conjugarse químicamente, o fusionarse mediante un enlace peptídico, a un segundo componente de unión que se une a la cápsula. Por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno de la invención puede usarse para proporcionar una especificidad en una molécula de unión biespecífica o incluso multispecífica, en la que la segunda (o una adicional) especificidad es para la cápsula y esta segunda (o especificidad adicional) se proporciona por una molécula (p. ej. un fragmento de unión al antígeno) que se une específicamente a la cápsula.

En un aspecto adicional, el componente de anticuerpo del conjugado de proteína se conjuga químicamente con dos o más componentes tóxicos. El componente tóxico adicional puede estar en la forma de una proteína o resto peptídico o en la forma de una entidad química pequeña. Cuando al menos un componente tóxico adicional es una proteína o resto peptídico, el componente adicional puede ser una toxina, como se ha descrito anteriormente. Cuando al menos un componente tóxico adicional es una entidad química pequeña puede ser un compuesto tóxico como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En determinadas realizaciones de este aspecto de la invención, se crean conjugados de proteína que comprenden un componente de anticuerpo como se describe en la presente memoria, conjugado químicamente con al menos dos componentes adicionales, cada uno de los cuales otorga una función de control de roedores (es decir, tóxica) al conjugado de proteína.

El segundo componente adicional (y componente o componentes adicionales) puede (cada uno) tener las mismas funciones de control de roedores que el primer componente adicional y cuando tiene (tienen) la misma función puede (pueden) tener el mismo, o diferente (diferente independientemente) modo de acción, como se ha descrito anteriormente respecto a las proteínas de fusión de la invención. En una realización particular, el conjugado de proteína comprenderá un componente de anticuerpo como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, conjugado químicamente con una o más moléculas de un segundo componente tóxico. El sitio o sitios de la conjugación dependerán de la química usada para la reacción de conjugación. Cuando se desea que los dos componentes adicionales diferentes se conjuguen con el primer (anticuerpo) componente, puede ser deseable usar un método químico de conjugación diferente para cada componente adicional con el fin de asegurar que los componentes adicionales diferentes no compitan entre sí para la conjugación en el mismo sitio del primer componente.

En un aspecto adicional más de la invención, se proporciona un agente de control de roedores que comprende una proteína de fusión o conjugado de proteína como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, en el que la proteína de fusión o conjugado de proteína comprende al menos dos componentes de anticuerpo. En una realización, cada componente de anticuerpo se une a la misma proteína diana, incrementando así la probabilidad del agente de control de roedores de unirse a su tejido diana y también incrementando potencialmente la avidez de la unión del agente de control de roedores. En dichas realizaciones, los componentes de anticuerpo pueden ser idénticos o diferentes. Cuando los componentes de anticuerpo son diferentes, esto engloba diferentes componentes de anticuerpo que se unen al mismo RSE o RSPE en una proteína diana, o más preferiblemente diferentes componentes de anticuerpo uniéndose cada componente de anticuerpo a un RSE o RSPE diferente en la misma proteína diana. En una realización adicional, el agente de control de roedores comprenderá componentes de anticuerpo que se unen al menos a dos proteínas diana diferentes. Las realizaciones que comprenden componentes de anticuerpo que se unen a RSE o RSPE diferentes en una única proteína diana y/o que comprenden componentes de anticuerpos que se unen a proteínas diana diferentes, pueden ser particularmente útiles para retardar la aparición de resistencia que ocurre con el agente de control de roedores o para contrarrestar la resistencia en uno de los sitios diana potenciales.

Los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, proteínas de fusión y conjugados de proteína de la invención son útiles para controlar roedores, por ejemplo pueden usarse en métodos para matar roedores. Así, en un aspecto adicional se proporciona un agente de control de roedores que comprende o consiste en un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, proteína de fusión o conjugado de proteína como se describe en la presente memoria.

Las proteínas de fusión y conjugados de proteína de la invención, en los que el segundo componente de proteína es una toxina o en los que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se conjuga con un compuesto tóxico o toxina proteica/peptídica, conseguirán el control de roedores matando a los roedores (es decir, dichas proteínas de fusión y

conjugados de proteína son rodenticidas en su modo de acción). Cuando el componente de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno reconoce una proteína expresada en el epitelio del tracto GI de los roedores, la proteína de fusión o conjugado de proteína se unirá al epitelio. Dependiendo del tipo de toxina o compuesto tóxico presente en la proteína de fusión/conjugado de proteína, la toxina o compuesto tóxico puede desorganizar la membrana celular. Se compromete así la integridad del epitelio del tracto GI y las lesiones que se producen en el tracto GI darán lugar a la muerte del roedor. Alternativamente, cuando la toxina o compuesto tóxico media toxicosis mediante un modo de acción intracelular, la proteína de fusión o conjugado de proteína unido se basa en la internalización mediante endocitosis. Una vez que la proteína de fusión o conjugado de proteína ha entrado en la célula, la toxina/compuesto tóxico será capaz de mediar la toxicosis, que resultará finalmente en la muerte del roedor. La presente invención también describe proteínas de fusión en las que el segundo componente de proteína es un inmunógeno y también requiere la captación en el interior de las células de roedor. Una vez presente en el interior de la célula de roedor, se desencadena una respuesta inmune frente al inmunógeno. Así, cuando el inmunógeno es un antígeno específico de óvulo o de espermatozoos, esto resulta en la generación de una respuesta inmune que impide que ocurra la reproducción. Ventajosamente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la proteína de fusión incrementará la cantidad de inmunógeno que se absorbe en el roedor (mediante endocitosis) y también puede actuar como un adyuvante, incrementando así la probabilidad de que se desencadene una respuesta inmune adecuada.

También se describen proteínas de fusión y conjugados de proteína, en los que el segundo componente de proteína o conjugado es un componente de hormona o semejante a hormona que requiere de manera similar la captación en las células de roedor. Una vez presente en el interior de una célula de roedor, la hormona/compuesto semejante a hormona interferirá con el control hormonal de la reproducción y controlará así a los roedores impidiendo la reproducción.

La especificidad para roedores de la parte de anticuerpo/unión al antígeno de las proteínas de fusión y conjugados de proteína descritos en la presente memoria, otorga varias ventajas a los agentes de control de roedores de la invención. La alta especificidad para el tejido de roedor significa que el agente de control de roedores está dirigido específicamente a un tejido de roedor facilitando así la captación/actividad del componente tóxico.

A su vez, este direccionamiento específico significa que es probable que se requiera menos agente de control de roedores para un control eficaz, menos agente de control de roedores está presente en el medioambiente y que el que está presente en el medioambiente no es específico para, y así es menos probable que sea absorbido por y cause daño a, especies no diana.

Los agentes de control de roedores de la invención pueden formularse como una composición que comprende como ingrediente activo una proteína de fusión o conjugado de proteína de la invención en combinación con al menos un aditivo, diluyente y/o vehículo. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, compuestos que actúan como atrayentes para roedores, compuestos que hacen que la composición tenga un sabor más agradable para los roedores, agentes de control de roedores adicionales y compuestos que sirven para estabilizar o proteger el o los agentes de control de roedores. Los compuestos atrayentes adecuados incluyen materiales alimenticios tales como trigo, cebada, maíz, sorgo, avena, arroz y mijo. Los compuestos que incrementan el sabor agradable adecuados para usarse en la invención incluyen edulcorantes (p. ej. acesulfamo-K, alitamo, aspartamo, brazeína, ciclamato, sacarina, sucralosa, sacarosa, glucosa, sorbitol, manitol, xilitol, taumatina, monelina, isomaltita e isomaltulosa), aceites vegetales o animales (p. ej. aceite de maíz, de soja y de cacahuete, aceite de pescado) y levadura seca. Los compuestos que incrementan la estabilidad/protección adecuados incluyen aquellos que protegen o impiden que el agente o agentes de control de roedores experimenten proteólisis o hidrólisis después de la ingestión por el roedor, por ejemplo antiácidos y compuestos que pueden usarse en la formación de cápsulas con liberación por pH.

Los diluyentes y vehículos adecuados para usarse en las composiciones de la invención incluyen aquellos que se usan como diluyentes y/o vehículos con agentes de control de roedores conocidos, por ejemplo, ceras y agentes de unión p. ej. éteres de celulosa, almidón, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, goma de guar, carragenina, gelatina, goma de karaya, goma xántica, goma arábiga, garrofín, tragacanto, pectina y poliacrilatos.

Las composiciones de la invención pueden comprender además de y/o en lugar de uno cualquiera de los aditivos, diluyentes o vehículos mencionados anteriormente, agentes de control de roedores adicionales tales como los mencionados anteriormente en la presente memoria en la introducción de la invención. En particular, la presente invención también incluye mezclas de uno o más de los nuevos agentes de control de roedores descritos en la presente memoria en combinación con al menos un anticoagulante de primera generación y/o al menos un anticoagulante de segunda generación. Los anticoagulantes de primera generación preferidos para usarse en este aspecto de la invención incluyen las hidroxycumarinas y las indano-dionas, siendo las hidroxycumarinas particularmente preferidas warfarina, cumacoloro, cumafurilo y cumatetralilo y siendo las indano-dionas particularmente preferidas pindona, difacinona y clorfacinona.

Los anticoagulantes de segunda generación preferidos para usarse en este aspecto de la invención incluyen bromadiolona, brodifacum, difenacum, flocumafen y difetialona.

La presente invención también engloba mezclas de al menos dos de los nuevos agentes de control de roedores como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, así como composiciones (como se ha descrito anteriormente) que comprenden dichas mezclas. Por ejemplo, cuando un agente de control de roedores es un componente de anticuerpo que se une a un epítipo extracelular de una proteína que se expresa en roedores (es decir, el componente de anticuerpo *per se* es el agente de control de roedores funcional), éste puede combinarse con uno o más agentes de control de roedores adicionales, en el que el agente de control de roedores adicional comprende un componente de anticuerpo y uno o más componentes tóxicos (es decir, uno o más agentes de control de roedores adicionales es o son una proteína de fusión o conjugado de proteína como se describe en la presente memoria). En realizaciones adicionales, la mezcla comprenderá dos o más proteínas de fusión y/o conjugados de proteína como se describe en la presente memoria.

En una realización, las proteínas de fusión de la invención se producen en plantas y el material de plantas que contiene la proteína de fusión expresada se usa como cebo para el control de roedores. Preferiblemente, la planta que produce la proteína de fusión será una que es capaz de actuar como una fuente de alimento para roedores, por ejemplo, trigo, cebada, maíz, sorgo, avena, arroz y mijo son todas plantas adecuadas para la expresión de proteínas de fusión de la invención, según este aspecto de la invención. En una realización, se prefiere particularmente que la proteína de fusión se exprese en las semillas de la planta. De esta manera, el grano de las plantas que expresan una proteína de fusión de la invención puede usarse directamente como cebo.

Como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, las composiciones de la invención, así como las plantas y/o granos que contienen las proteínas de fusión de la invención, pueden usarse como agentes de control de roedores. De acuerdo con esto, en un aspecto adicional más, la invención proporciona un método para matar roedores, que comprende poner un agente de control de roedores en un área frecuentada por un roedor, de manera que después de la ingestión por dicho roedor de dicho agente de control de roedores, dicho roedor muera. El experto en la técnica también apreciará que también se describe en la presente solicitud un método para impedir que los roedores se reproduzcan que comprende poner un agente de control de roedores en un área frecuentada por un roedor, de manera que después de la ingestión por dicho roedor de dicho agente de control de roedores, se inhiba la capacidad reproductora de dicho roedor.

Con el fin de ensayar la eficacia de los agentes de control de roedores de la invención pueden realizarse varios estudios *in vitro* e *in vivo*. Un ejemplo de un ensayo *in vitro* adecuado es el ensayo del intestino ligado como se describe en Heylings 1991 (Toxicol. Appl. Pharmacol. 107:482-293) y en el Ejemplo 9.

Las estrategias típicas para la evaluación *in vivo* de las propiedades rodenticidas de los agentes de control de roedores de la invención se basan en los requerimientos siguientes: 1) minimizar el número de animales usados en los ensayos, 2) mantener los costes bajos, 3) producir información útil rápidamente, 4) no rechazar sustancias activas que pueden ser prometedoras.

Los ensayos iniciales se realizarán habitualmente en el laboratorio porque pueden controlarse cuidadosamente las condiciones del ensayo. Se usa una cascada de procedimientos de ensayo. Esta cascada permite aceptar o rechazar sustancias activas usando un proceso de decisión secuencial. Los sujetos de ensayo habituales son la rata Norway, *Rattus norvegicus*, y el ratón casero, *Mus domesticus*. La rata Roof es otro sujeto de ensayo importante pero como no está disponible como cepa de laboratorio sólo se ensaya en las últimas etapas de un programa de evaluación. Las cepas de roedores que son resistentes a los anticoagulantes también pueden usarse en las últimas etapas de un programa de laboratorio con el fin de ensayar la eficacia frente a estos animales.

Los agentes de control de roedores de la invención que son activos y se muestran prometedores en los ensayos de laboratorio pueden evaluarse en el campo. Los ensayos de campo se realizan frente a todas las especies de roedores que son plagas importantes en varias circunstancias naturales.

Se remite al experto en la técnica a los documentos de directrices que están disponibles fácilmente y que muestran procedimientos de ensayo lógicos para rodenticidas en el laboratorio (EPPO/OEPP. 1999. Laboratory tests for evaluation of the toxicity and acceptability of rodenticides and rodenticide preparations; OEPP/EPPO PP 1/113(2): 89-101) y en el campo (EPPO/OEPP. 1999. Guidelines for the Efficacy Evaluation of Plant Protection Products: Field-tests against synanthropic rodents *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *R. rattus*; OEPP/EPPO PP 1/114(2):102-113). También están disponibles recomendaciones para procedimientos de ensayo que satisfacen los requerimientos reguladores en el Reino Unido (Anónimo. 2005. Guidelines on the Efficacy Data Requirements for Approval of Non-agricultural Pesticide Products Rodenticides. Health and Safety Executive, Bootle, Reino Unido. 30 p), la Unión Europea (Anónimo. 2002. Technical notes for guidance in support of the Annex VI of Directive 98/8/EC of the European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Common principles and practical procedures for the authorisation and registration of products. Comisión Europea, Julio 2002. 215 p.) y los Estados Unidos.

Una cascada típica de ensayos que puede seguirse en el laboratorio con el fin de evaluar la eficacia de los agentes de control de roedores de la invención puede incluir ensayos de intubación oral, ensayos de alimentación sin

elección y ensayos de alimentación con elección. A continuación se explican los detalles adicionales de estos ensayos.

Intubación Oral: los ensayos iniciales para establecer la potencia de las sustancias activas implica la administración de la sustancia activa, transportada en un líquido inerte tal como polietilén glicol, directamente en el estómago de los sujetos de ensayo usando una sonda nasogástrica. De esta manera pueden administrarse dosis exactas con el fin de determinar las estadísticas en percentiles de la dosificación letal. El ensayo proporciona información acerca de la capacidad de la sustancia activa para permanecer activa en las condiciones encontradas en el intestino de la especie del sujeto y de su transferencia a través de las membranas del intestino. El ensayo también proporciona información acerca de la toxicidad intrínseca de la sustancia activa.

Ensayos de Alimentación Sin Elección: virtualmente todos los productos rodenticidas comerciales se presentan como cebos formulados. La etapa siguiente en la cascada de ensayo implica la preparación de un cebo que contiene la sustancia activa (en este caso el agente de control de roedores de la invención). En primer lugar se realiza un ensayo 'sin elección', en el que a los sujetos de ensayo en jaulas individuales sólo se les presenta el cebo experimental, para establecer si la sustancia activa es activa cuando se administra como un cebo comestible. El cebo de ensayo está disponible normalmente *ad libitum*. Además de la información semejante a la obtenida en los ensayos de intubación oral, los ensayos de alimentación sin elección proporcionan información acerca de la capacidad de la sustancia activa para ser eliminada del cebo por los procesos digestivos de la especie del sujeto.

Ensayos de Alimentación Con Elección: para poder controlarlos a través de una sustancia activa en un cebo formulado, los roedores deben consumir cantidades suficientes del cebo para adquirir una dosis letal en presencia de alimentos naturales alternativos. Por lo tanto, el sabor agradable de la sustancia activa (es decir, un agente de control de roedores de la invención) es un aspecto importante de la evaluación. Se realizan ensayos con elección en los que la sustancia activa se añade a una base de cebo en concentraciones medidas. Se ofrece a sujetos de ensayo en jaulas individuales una elección entre un cebo de ensayo que contiene la sustancia activa y un cebo idéntico pero sin la sustancia activa. Se realiza una serie de dichos ensayos para establecer la concentración de la sustancia activa que es detectada por los sujetos de ensayo. Normalmente, dicha detección se demuestra por una aversión al cebo que contiene la sustancia activa. Una consideración importante en la evaluación es que la concentración detectada por los sujetos de ensayo, y que incita una aversión significativa, es menor que la concentración requerida para administrar una dosis letal en un cebo de ensayo.

Se realizan ensayos con elección adicionales en cebos experimentales que se producen durante el desarrollo de las formulaciones comerciales. Estos ensayos con elección implican la presentación de la formulación experimental y una 'dieta challenge'. La dieta challenge está compuesta por lo que presenta una alternativa con un sabor razonablemente agradable a la formulación experimental. Una 'dieta challenge' típica usada en dichos ensayos es 'alimento EPA'.

Ésta es una formulación que comprende cantidades fijas de avenas, sémola de maíz, azúcar y aceite. Es una práctica normal que una formulación experimental cuyo consumo comprenda un mínimo de 30% de la dieta challenge combinada y la formulación experimental consumida por los sujetos de ensayo se considerará un candidato potencial para los ensayos de campo.

Después de los ensayos de laboratorio, la eficacia puede ensayarse en un entorno de campo. Los roedores tienen comportamientos complejos y altamente adaptativos que sólo se presentan completamente en condiciones naturales. Por lo tanto, pueden realizarse ensayos de campo con el fin de evaluar la eficacia de la sustancia activa rodenticida y productos formulados en condiciones de campo. Normalmente, los ensayos de campo se realizan frente a un rango de especies diana en varios entornos naturales que son típicos respecto a los que podrían realizarse los tratamientos de control de roedores en la práctica.

Los ensayos de campo pueden realizarse en una etapa temprana del desarrollo del producto usando formulaciones experimentales, que no se pretende comercializar, con el fin de investigar los procesos de comportamiento naturales en la especie de roedor diana cuando se les presenta un cebo típico que contiene la sustancia activa.

Los ensayos de campo también pueden realizarse posteriormente en productos cebo comerciales para demostrar su eficacia en condiciones prácticas.

Ahora se ilustrarán varios aspectos y realizaciones de la presente invención con más detalle como ejemplo. Se apreciará que pueden hacerse modificaciones de los detalles sin apartarse del alcance de la invención.

Para evitar cualquier duda, las referencias bibliográficas, solicitudes de patente o patentes, que se citan en el texto de esta solicitud, el texto completo de dicha cita se incorpora en la presente memoria por referencia.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1 Inhibición de la traducción de la luciferasa por gelonina recombinante.

Figura 2 Inhibición de la traducción de la luciferasa por el conjugado anticuerpo policlonal anti-CNT2-gelonina recombinante. Las muestras del Grupo A corresponden a la fracción combinada de la purificación IMAC que se determinó que contenían anticuerpo libre. Las muestras del Grupo B corresponden a las fracciones combinadas de la purificación IMAC que se determinó que contenían conjugado anticuerpo-toxina.

EJEMPLOS**EJEMPLO 1 GENERACIÓN Y PREPARACIÓN DE RSPE****1.1 Selección y síntesis de péptidos**

Las dianas proteicas potenciales, presentes en el epitelio intestinal de los roedores, se identifican por métodos bibliográficos y bioinformáticos. Los epítomos peptídicos específicos de roedores (RSPE) se identifican en estas proteínas tomando como base los criterios siguientes: alta identidad de secuencia (preferiblemente entre 80 y 100% de identidad) entre las secuencias de ratón y rata y baja identidad de secuencia (preferiblemente entre 0 y 40% de identidad) entre la secuencia de roedor y humana y sin resultados significativos con otras especies usando alineamientos BLAST; sus perfiles de hidrofiliidad (indicador de probabilidad de superficie); predicciones de flexibilidad y estructura secundaria. Los algoritmos usados para predecir la hidrofiliidad, flexibilidad y estructura secundaria se proporcionan por los programas en la serie de programas DNASTar y Vector NTI.

Una vez que se ha identificado un RSPE adecuado, el péptido se sintetiza usando síntesis en fase sólida Fmoc y se purifica hasta aproximadamente un 90% de pureza. Se han sintetizado los péptidos mostrados en la Tabla 3 a continuación.

Cuando es adecuado, se añade una cisteína N terminal a la secuencia para permitir la conjugación dirigida con una proteína transportadora. Alternativamente, y cuando sea adecuado, la secuencia se sintetiza con el aminoácido N terminal sin bloquear para permitir la conjugación dirigida con una proteína transportadora. Cuando no se requiere para la conjugación, el aminoácido N terminal se bloquea por acetilación. Además, el aminoácido C terminal se bloquea con un grupo amida.

Tabla 3 RSPE que se han sintetizado

Proteína Fuente	Secuencia primaria de aminoácidos del RSPE	SEQ ID NO:
Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata	VIRSRASDGCLEVKE	SEQ ID NO: 1
Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata	CSSDFKSSNLD	SEQ ID NO: 2
CD 155 de rata (PVR, Tage4)	SNVNGSYREMKETGSQP	SEQ ID NO: 3
Transportador de glucosa GTR2 (GLUT2) de rata	GTDTPLIVTPAHTTP	SEQ ID NO: 4
Transportador de cloro CFTR de rata	LK.NNPVNGGNNGTKIA	SEQ ID NO: 5
Transportador de nucleósidos CNT2 de rata	WQDKESSLRNLAK	SEQ ID NO: 6
Transportador de aminoácidos colónico CATB(0+) (slc6a14) de rata	GGDMFMNISWVN	SEQ ID NO: 7
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de rata	SFTPSRDPHSDRAIT	SEQ ID NO: 8
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de ratón	SFTKAEASILPSIT	SEQ ID NO: 9

Proteína Fuente	Secuencia primaria de aminoácidos del RSPE	SEQ ID NO:
Sacarasa-Isomaltasa de rata	YNAESITNENAGLKATL	SEQ ID NO: 10
Transportador de glucosa GLUT7 de ratón	NTPHKVLKSFYN	SEQ ID NO: 11
Transportadores de glucosa GLUT7 de ratón/GTR5 (GLUT5) de rata	YYDRNKENIES	SEQ ID NO: 12
Transportador de sodio/fosfato Npt2a (Slc34al) de rata	PETKEASTSMSRVEA	SEQ ID NO: 13
Polipéptido de transporte de aniones orgánicos OATP-B (SLC21A9) de rata	QPGPSLFPGCSEPCSCQ	SEQ ID NO: 15
Intercambiador cloruro/aniones DRA1 de rata	LSSSSAENDSMIEEKVMV	SEQ ID NO: 24
Transportador de nucleósidos equilibrativo ENTI de rata	TNQSCESTEALADPSVSL	SEQ ID NO: 26
GCC (Guanilil ciclasa) de rata	VSGRFPSEERS	SEQ ID NO: 27
PLB (Fosfolipasa B) de rata	AEDLWIQAKELVRHLKD NP	SEQ ID NO: 28
LPH (lactasa-florizin hidrolasa) de rata	EDAAPTASPVQS	SEQ ID NO: 29
AMPN (aminopeptidasa N) de rata	GSTSATTSTTNPA	SEQ ID NO: 31
MCDL (mucina y proteína semejante a cadherina) de rata	NKDILLTTVPMETERTIR	SEQ ID NO: 32
SCAB (subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida) de rata	SSNPAPGST	SEQ ID NO: 34

1.2 Conjugación de péptidos con BSA

Los péptidos que contienen un resto de cisteína N terminal se acoplan con BSA usando el agente de entrecruzamiento hetero-bifuncional éster de m-Maleimidobenzoyl-N-hidroxysuccinimida. El acoplamiento es a través de las aminas primarias de los restos de lisina en BSA y los grupos sulfidrilos en los restos de cisteína en el péptido como describen Kitagawa y Aikawa. J. Biochemistry Vol 79: p 233-236 (1976).

Se prepara una disolución de 25mg/ml de BSA (Sigma, Poole, Dorset) en 0,2M fosfato de sodio, pH 7,0 y una disolución de 25mg/ml de MBS (Perbio, Cheshire) preparada en dimetilformamida (Sigma). Se añaden 30µl de disolución MBS gota a gota a 1ml de la disolución de BSA con mezclado y se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 45 minutos. La disolución de BSA activada se pasa a través de una columna de filtración en gel PD10 (GE Healthcare, Buckinghamshire), que se había equilibrado previamente con 0,2M fosfato de sodio, pH 7,0.

Las fracciones que contienen BSA se identifican por absorbancia a 280nm y se combinan. Se disuelven 2mg de péptido en 1ml de 50mM fosfato de sodio, pH 7,5. Se añade disolución suficiente de BSA activada al péptido para conseguir una relación molar 30:1 de péptido:BSA. Esto se incuba a temperatura ambiente durante 4 horas y toda la noche a 4°C en la oscuridad con mezclado. Los péptidos conjugados se almacenan a -20°C.

Los péptidos que contienen restos de lisina o aminas primarias en el extremo N terminal se acoplan con BSA usando el método de 2 etapas del glutaraldehído. El acoplamiento es entre los grupos amino primarios en el BSA y el péptido tomando como base el método de Bio-conjugate Techniques, Academic Press 1996, p 583-584.

Se prepara una disolución de 10mg/ml de BSA en 0,1M fosfato de sodio, 0,15M cloruro de sodio pH6,8. Se añade glutaraldehído (Sigma) hasta una concentración final de 1,25% y la mezcla se incuba con mezclado durante 12 horas a temperatura ambiente. La BSA activada se pasa a través de una columna de filtración en gel PD10, que se había equilibrado previamente con PBS. Las fracciones que contienen BSA se identifican por absorbancia a 280nm y se combinan. Se disuelven 2mg del péptido en 1ml de 0,5M carbonato de sodio pH9,5 y se añade disolución suficiente de BSA activada al péptido para conseguir al menos una relación molar 10:1 péptido:BSA. La mezcla se incuba toda la noche a 4°C. Los sitios reactivos en exceso se bloquean por la adición de 40µl de 1M etanolamina (Sigma). Los péptidos conjugados se almacenan a -20°C.

EJEMPLO 2 GENERACIÓN DE COMPONENTES DE ANTICUERPO

Los péptidos que se han sintetizado y conjugado con BSA como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior se usan para generar anticuerpos que se unen a un epítipo extracelular de una proteína expresada en un roedor.

2.1 Protocolo de Inmunización de Conejos

5 Se usan conejos blancos de Nueva Zelanda para la producción de anticuerpo policlonal. Los conejos se inmunizan con 100µg de proteína administrada subcutáneamente usando adyuvante de Freund Completo (Sigma) para la primera dosis. Esto se sigue de tres inmunizaciones de refuerzo en los días 28, 56 y 84 que contienen 100µg de proteína administrada subcutáneamente en adyuvante de Freund Incompleto (Sigma). Se toman presangrados antes de la inmunización inicial, se toman sangrados de ensayo 10-14 días después de la tercera dosis y se toman sangrados de recogida 10-14 días después de la cuarta dosis.

Para cada uno de los RSPE siguientes se inmunizaron dos conejos y se generaron sueros con anticuerpo policlonal: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15.

15 Para cada uno de los RSPE siguientes se inmunizó un conejo: SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34.

2.2 Protocolo de Inmunización de Ratón/Hámster

20 Se usan ratones y hámsters para la producción de anticuerpo monoclonal y se inmunizan con 20µg de proteína administrada subcutáneamente en adyuvante de Freund Completo para la primera dosis. Esto se sigue de dos inmunizaciones de 20µg de proteína administrada subcutáneamente en los días 28 y 56. Las dosis se administran en adyuvante de Freund Incompleto en el día 28 y en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) en el día 56. Se toman sangrados de ensayo 7 días después de la dosis 3. Al menos 6 semanas después de la tercera dosis, a los ratones se les administran como refuerzo 20µg de proteína administrada por vía intravenosa en PBS. Se recogen los bazo para fusiones 4 días después.

25 Los ratones se inmunizaron con cada uno de los RSPE siguientes y se generaron sueros con anticuerpo policlonal: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29.

2.3 Producción de anticuerpos monoclonales

30 Los anticuerpos monoclonales se generan usando un método basado en Kohler G. y Milstein C. Nature 256, 495-497 (1975). Se lavan los linfocitos de los bazo recogidos con Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, Paisley) administrado con jeringas con agujas con un calibre 20. Se cultivan células de mieloma NS0 (European Collection of Cell Cultures, Porton Down, Salisbury) en DMEM que contiene 10% (v/v) de suero fetal bovino (PAA, Yeovil, Somerset), 2mM L-glutamina, 1xHT suplemento y 50 unidades/ml penicilina y 50µg /ml estreptomina (todos de Invitrogen) a 37°C en 5% CO₂ hasta una densidad de 5x10⁵/ml. Los linfocitos de un único bazo (aproximadamente 2x10⁸) se mezclarán con 2x10⁷ células de mieloma NS0. Después de centrifugar a 2.000 x g durante 4 minutos, el sedimento celular se resuspende con cuidado y se fusiona por la adición gota a gota de 1 ml de 50% (p/v) polietilén glicol (1500) en 75mM tampón HEPES pH8 (Roche, Lewes, East Sussex) durante un minuto.

35 El medio de cultivo completo (como se ha descrito anteriormente) suplementado con suplemento de clonación HI (Roche) se añade lentamente durante varios minutos hasta un volumen final de 50ml. La disolución de fusión resultante se cultiva en cinco placas de microtitulación de cultivo celular estériles (Nunc, Fisher, Loughborough, Leicestershire) a 100µl /pocillo durante 4 horas a 37°C en 5% CO₂ después de lo cual, se añaden 100µl/pocillo de medio de cultivo completo que contiene 4% (v/v) medio de selección 1xHAT (Invitrogen). Catorce días después de la fusión, los sobrenadantes del cultivo se ensayan para anticuerpos específicos del péptido usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de captura de anticuerpo (ELISA) basado en los métodos descritos por Engvall E., y Perlmann P. Immunochemistry 8, 871-874 (1971); Harlow E. *et al*, Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 p. 182-183. Las células de hibridoma seleccionadas se someten al menos a dos ciclos de clonación por dilución limitante seguido de un reensayo para asegurar tanto la clonabilidad como la estabilidad de los hibridomas. Se preparan bancos de hibridomas congelados en un medio de congelación compuesto por 10% (v/v) DMSO (Sigma, Poole, Dorset) en suero fetal bovino a una velocidad de congelación de 1°C/minuto durante 80 minutos seguido de almacenamiento en nitrógeno líquido. La producción de anticuerpos monoclonales seleccionados se consigue por escalado del cultivo de tejido.

50 Las fusiones de hibridoma se han obtenido usando linfocitos de los bazo de ratones inmunizados con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 27. Se han aislado 4 líneas celulares estables monoclonales que producen anticuerpos frente al RSPE de GLUT7 de ratón (SEQ ID NO 11), se han crecido y congelado. Se han aislado 4 líneas celulares estables monoclonales que producen anticuerpos frente al RSPE de

CFTR de rata (SEQ ID NO 5). Se han aislado siete líneas celulares positivas monoclonales que producen anticuerpos frente a un RSPE de PepT1 de rata (SEQ ID NO 1), se han crecido y congelado.

2.4 Identificación y aislamiento de componentes de anticuerpo de bibliotecas de exposición en fago

2.4.1 Cribado de la biblioteca de exposición en fago de V_{HH} de Camélido sin estimular

- 5 Se preparan RSPE para el cribado de un repertorio de exposición en fago de M13 filamentoso *Llama glama* V_{HH} sin estimular por síntesis química y conjugación posterior con BSA, como se ha descrito en el Ejemplo 1.2 anterior. El cribado de un repertorio de dominio de unión inmune expuesto en fago sigue los procedimientos establecidos, tales como los descritos por McCafferty y Johnson (en "Phage Display of Peptides and Proteins", p 98-100, Eds. Kay, Winter y McCafferty, 1996, Academic Press, Inc.).
- 10 Los conjugados RSPE::BSA se adhieren a la superficie interior de Inmunotubos Maxisorb (Nunc) por aplicación en tampón 50mM hidrógeno carbonato de sodio pH 9,6 a una concentración de 100µg/ml e incubación toda la noche. Los conjugados libres RSPE::BSA se eliminan por tres lavados en PBS y bloqueando la superficie por adición de PBS/2% proteína de leche desnatada (PBSM) e incubación a 37°C durante dos horas. Después de la sensibilización de los inmunotubos con el RSPE requerido, se efectúa "reconocimiento y selección" por la adición de 10^{12} a 10^{13}
- 15 fagos en 4ml de PBSM e incubando durante dos horas a temperatura ambiente. Después de esta etapa, los contenidos del tubo se aspiran y el tubo se lava veinte veces usando PBS/ 0,1% Tween 20, seguido de veinte lavados más con PBS. Los fagos unidos al inmunotubo (que representan una mayoría de RSPE::BSA-ligantes específicos V_{HH}) se eluyen por la adición de 1ml 100mM glicina pH 3,0 durante 10 minutos. La disolución se transfiere a un tubo fresco que contiene 0,5ml 1M Tris-HCl pH 7,4 para neutralizar. Los fagos eluidos se usan para infectar células TG1 de *E. coli* en fase logarítmica por mezclado e incubación a 37°C durante 30 minutos, seguido de siembra en una placa 24 x 24cm 2x TY/ 2%glucosa/100µg/ml ampicilina (Placa Nunc BioAssay) que se incuba a 37°C toda la noche. Al día siguiente, la placa se raspa para eliminar las células (que representan una población enriquecida, incrementada de clones de fagémido) que contienen secuencias con especificidad de unión para el conjugado RSPE::BSA. Con el fin de cribar/seleccionar clones adicionalmente de esta población que demuestran
- 25 alta afinidad para el RSPE, las partículas de fago se "rescatan" por la adición de fago auxiliar, p. ej. M13-K07, o VCS-M13. Brevemente, las células de la última etapa se inoculan en 50ml de 2x YT/ 2%glucosa/ 100ug/ml ampicilina en un matraz cónico de 250ml y se incuban a 30°C hasta que la DO_{600} es aproximadamente 0,5. El fago auxiliar se añade para proporcionar una relación 1:1 de fago auxiliar a bacteria, típicamente 2×10^{10} pfu/50ml, seguido de incubación a 37°C durante una hora. A continuación, las células se sedimentan por centrifugación a 3.000g durante 10 minutos, el sobrenadante se desecha, el sedimento celular se resuspende y se usa para inocular medio fresco en un matraz de 2 litros: 500ml 2x YT/ 100ug/ml ampicilina/ 50ug/ml kanamicina (sin glucosa). Este cultivo se incuba toda la noche a 30°C con agitación vigorosa y las partículas de fago- V_{HH} se recogen por la adición de 100ml 20% PEG/ 2,5M NaCl durante 30 minutos a 4°C. Los fagos precipitados se recogen por centrifugación a 4.000g durante 10 minutos y se resuspenden en 5ml PBS, listos para el siguiente ciclo de cribado. La eficacia del proceso de selección puede mejorarse por la reducción de la cantidad de conjugado RSPE::BSA usada para sensibilizar el inmunotubo en cada ciclo de reconocimiento y selección.
- 35

Además, el proceso de selección puede ajustarse para incluir etapas que influirán en la selección de partículas de fago $-V_{HH}$ que presentan determinadas características físico-químicas, tales como estabilidad proteolítica. Por ejemplo, se sabe que las partículas del fago M13 son resistentes a la proteólisis por determinadas enzimas proteolíticas, tales como tripsina y quimotripsina (Schwind et al, 1992, Eur. J. Biochem. 210: 431-436), y que esta propiedad puede explotarse en la exposición en fagos para la selección de variantes estructuralmente estables (Kristensen y Winter, 1998, Folding & Design, 3:321-328).

- 45 Con el fin de seleccionar clones individuales que presentan la afinidad y selectividad deseadas para el RSPE, se cogen colonias únicas en una placa 2x TY/ 2%glucosa/ 100µg/ml ampicilina (obtenida de muestras diluidas de forma seriada del TG1 *E. coli* infectada por el fago eluido después de una etapa de reconocimiento y selección) y se disponen en un bloque de cultivo de 96 pocillos que contiene 150µl 2x TY/ 2%glucosa/ 100µg/ml ampicilina por pocillo y se incuba con agitación a 30°C hasta que la DO_{600} alcanza aproximadamente 0,5. Se añaden fagos auxiliares a cada pocillo para proporcionar una relación 1:1 de fago auxiliar:bacteria, seguido de incubación adicional con agitación a 37°C durante una hora. El medio se elimina después de sedimentar las células por centrifugación a 3.000g y se reemplaza por 1,5ml de 2x YT/ 100µg/ml ampicilina/ 50µg /ml kanamicina (sin glucosa) y se permite que la incubación continúe con agitación vigorosa a 30°C toda la noche. Las partículas de fago se recogen de cada pocillo usando 20% PEG/ 2,5M NaCl durante 30 minutos a 4°C seguido de centrifugación a 4.000g y resuspensión en PBS. Estas muestras de fago clonales se usan en un ELISA para determinar la afinidad de unión relativa para RSPE inmovilizado, usando un complejo anticuerpo anti-fago-HRP, o, alternativamente, se expresan V_{HH} solubles por infección de un anfitrión supresor no ámbar de *E. coli*, (tal como la cepa HB2151) con el fago. Es entonces posible el cultivo en 96 pocillos y la expresión de V_{HH} secretada, soluble usando inducción con IPTG y se usa bien medio de cultivo crudo (que contiene V_{HH} soluble), o, V_{HH} purificada por IMAC (mediante una etiqueta integral de hexa-histidina) en ELISA para determinar la unión a RSPE inmovilizado. Un anticuerpo de detección adecuado es en
- 50
- 55

este caso 9E10-HRP (Roche Molecular Biochemicals) que detecta la etiqueta c-Myc presente en la proteína V_{HH} soluble.

Inicialmente, los RSPE siguientes se criban como conjugados RSPE::BSA frente a una biblioteca de exposición en fagos de Camélido sin estimular como se ha descrito anteriormente: RSPE con SEQ ID NO 5, RSPE con SEQ ID NO: 6, RSPE con SEQ ID NO: 11 y RSPE con SEQ ID NO 27. Los clones V_{HH} identificados con este cribado se usan en la producción de proteínas de fusión y conjugados de anticuerpo como se describe en la presente memoria.

2.5 Clonación y Expresión de Dominios de Unión de Anticuerpo Recombinantes

Para ejemplificar el proceso de crear anticuerpos de cadena única, más específicamente scFv, el anticuerpo monoclonal (Mab) de ratón SV63 (que reconoce un epítipo de la superficie celular de la fosfatasa alcalina humana expresado por determinados tumores colorrectales) del hibridoma HB-8766 (American Type Culture Collection; Rettig et al, 1989, US4851332) se usa como una proteína modelo de unión al antígeno de la superficie celular. Con el fin de derivatizar una molécula scFv de este IgG1 Mab las secuencias Fv se clonan a partir del hibridoma usando RT-PCR con Fv de roedor y conjuntos de cebadores específicos del dominio constante como se describe en la bibliografía (p. ej. Dubel et al. 1994, Journal of Immunological Methods 175: 89-95; McCafferty y Johnson en "Phage Display of Peptides and Proteins", p 95, Eds. Kay, Winter y McCafferty, 1996, Academic Press, Inc.), usando las modificaciones en los cebadores individuales como se especifica en la bibliografía. Las secuencias de los cebadores usados en este Ejemplo se proporcionan en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4 Cebadores usados en la clonación de los scFv de SV63 de hibridomas ATCC HB-8766

Cebador	Secuencia 5' a 3'	SEQ ID
RoPro-9	AGGTSCAGCTGCAGSAGTCWGG	SEQ ID NO:
37		
RoPro-28	CCAGGGGCCAGTGGATAGACAGATGGGGGT	SEQ ID NO:
GTCGTTTT	38	
RoPro-6	GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGC	SEQ ID NO:
CTGGTG	39	
RoPro-25	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCC	SEQ ID NO:
C	40	
RoPro-3	GGTGATATCGTKCTCACYCARTCTCCAGCAA	SEQ ID NO:
T	41	
RoPro-4	GGGAAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAG	SEQ ID NO:
C	42	
scFv oligo	AGCCCGCCATGGCCGATATCGTTCTCACTCA	SEQ ID NO:
1	ATC	43
scFv oligo	CGCCAGAGCCACCGCCACCGCTACCGCCACC	SEQ ID NO:
2	GCCCTTGATCTCCAGTTTGGTGCCTC	44
scFv oligo	AGCGGTGGCGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGTA	SEQ ID NO:
3	GCGAGGTCCAGCTGCAGGAGTCTGG	45
scFv oligo	CTATGAATTAGTGGTGGTGGTGGTGGT	SEQ ID NO:
4	TGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCTGAGGAGACT	46
GTGAGAGTGGTGC		
scFv oligo	AGCCCGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGCAGGA	SEQ ID NO:
5	GTCTG	47

scFv oligo	CGCCAGAACCACCTCCGCCGCTTCCGCCACC	SEQ ID NO:
6	GCCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	48
scFv oligo	AGCGGCGGAGGTGGTTCTGGCGGTGGCGGA	SEQ ID NO:
7	AGCGATATCGTTCTCACTCAATCTC	49
scFv oligo	GTATGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCT	SEQ ID NO:
8	TGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTCCTTGATCTCC	50

AGTTTGGTG CCTC

2.5.1 Aislamiento de ARN de Hibridoma y síntesis de ADNc

10 Las células de hibridoma (10^7) se centrifugaron y se resuspendieron en 1ml de Trizol™ y 200µl de cloroformo. La muestra se mezcló vigorosamente durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. La capa acuosa se eliminó y se añadió una cantidad igual de isopropanol. La muestra se centrifugó a 12.000rpm durante 15 minutos a 4°C para precipitar el ARN, que se lavó en 70% etanol y se resuspendió en agua sin ARNasa.

15 Se eliminaron las trazas de ADN genómico del ARN por tratamiento con ADNasa sin ARNasa en una reacción de 10µl que contiene 5µl ARN, 0,1U ADNasa I sin ARNasa (Ambion) y 1U RNasin. La mezcla se puso a 37°C durante 30 minutos seguido de una incubación a 80°C durante 5 minutos.

El ARN tratado con ADNasa I se usó en una reacción Accuscript (Stratagene) bajo las condiciones estándar del fabricante (1,5µl ARN, 50µl volumen total de la reacción, cebador oligo-dT) para producir ADNc de 1ª cadena.

2.5.2 Aislamiento y clonación de la región V_H de SV63

20 Se realizó PCR usando 1µl del ADNc de 1ª cadena cebado con oligo-dT obtenido del ARN de SV63 como molde y los oligonucleótidos RoPro-9 (SEQ ID NO: 37) y RoPro-28 (SEQ ID NO: 38).

El Sistema GC-RICH PCR de Roche se usó con tampón de resolución GC-RICH a una concentración de 0,5M en un volumen de reacción de 25µl.

La reacción se realizó en un Stratagene Robocycler con las condiciones de ciclación siguientes:

25	<u>Ciclo 1-5</u>	<u>Ciclo 6-35</u>	<u>Extensión final</u>
	94°C 30 seg	94°C 30 seg	
	54°C 30 seg	60°C 30 seg	
	72°C 60 seg	72°C 60 seg	72°C 300 seg

30 El rendimiento del producto de PCR fue muy bajo en esta reacción. Por lo tanto, se realizó una segunda PCR para amplificar más las moléculas producidas.

Usando los 2µl del producto de PCR de la reacción descrita anteriormente como molde, se pusieron a punto dos reacciones usando las parejas de cebadores oligonucleotídicos siguientes: i) RoPro-6 (SEQ ID NO 39, menos específica que RoPro-9 (SEQ ID NO 37) y RoPro-25 (SEQ ID NO: 40, 3' anidada) y ii) RoPro-9 (SEQ ID NO 37) y RoPro-28 (SEQ ID NO: 38). La PCR se realizó como se ha descrito anteriormente.

35 Cuando las muestras de las reacciones anteriores se corrieron en un gel 1% agarosa/TBE y se tiñeron con bromuro de etidio, ambas PCR contenían fragmentos de ADN de aproximadamente 400 pb. El producto de PCR resultante de la reacción 2 anterior se aisló y purificó usando el kit GeneClean Spin y se clonó en pCRTOP0 BluntII (Invitrogen).

40 Se caracterizaron completamente ocho clones TOPO por secuenciación de ADN, uno de estos clones tenía las características de una secuencia V_H típica (pero única) según se determinó por análisis BLASTP de las bases de datos UniProt/IPI.

2.5.3 Aislamiento y clonación de la región V_L de SV63

Se realizó PCR usando 2µl del ADNc de 1ª cadena cebado con oligo-dT obtenido del ARN de SV63 como molde y los oligonucleótidos RoPro-3 (SEQ ID NO: 41) y RoPro-4 (SEQ ID NO: 42). Se usó ADN polimerasa Pfu Ultra de Stratagene en un volumen de reacción de 50µl y la reacción se realizó en un termociclador MJ Research Dyad

usando las condiciones de ciclación siguientes: 95°C, 1min después [95°C, 1min; 52°C, 1min; 68°C, 3mins] durante 40 ciclos, seguido de una extensión final de 68°C 10 mins.

Una muestra de la reacción anterior se analizó en un gel 1% agarosa/TBE y se tiñó con bromuro de etidio, se observó un fragmento de aproximadamente 350 pb. Este producto de PCR se aisló y se purificó usando elución en gel QiaQuick (Qiagen) y se clonó en pCRTOPBlunt II (Invitrogen).

Se caracterizaron completamente cinco clones TOPO por secuenciación de ADN, cuatro de estos clones fueron idénticos y tenían las características de una secuencia VL típica (pero única) según se determinó por análisis BLASTP de las bases de datos UniProt/IPI. Uno de los cinco clones contenía una secuencia que era idéntica a la secuencia variable de la cadena ligera kappa de MOPC21 (Swissprot: P01634), una secuencia irrelevante amplificada a partir del equivalente de fusión de mieloma usado en la creación del hibridoma.

2.5.4 Ensamblaje de las secuencias V_H y V_L en Construcciones scFv

Se usó PCR con extensión por superposición (también conocida como "Empalme con extensión por superposición"; SOE) para crear dos orientaciones de scFv de SV63: (i) V_H-conector [Gly₄Ser]₃-V_L y (ii) V_L-conector [Gly₄Ser]₃-V_H, cada una contiene secuencias líder N terminal PelB y etiquetas C terminales de FLAG y hexa-histidina en los vectores de expresión de *E. coli* pDGF (obtenido del vector de NEB pMALc-2, pDGF contiene todas las características de pMALc-2 excepto la secuencia que codifica la proteína de unión a la maltosa, que se ha escindido) y pIMS147 (Hayhurst y Harris, 1999, Protein Expression and Purification 15: 336-343). La Tabla 5 a continuación indica los cebadores oligonucleotídicos usados y su propósito.

Tabla 5 Cebadores usados en el ensamblaje de las secuencias V_H y V_L en las construcciones scFv

Cebador	Propósito	SEQ ID NO:
scFv oligo 1	SV63 scFv VL::VH orientación PelB:VI cebador directo	43
scFv oligo 2	SV63 scFv VL::VH orientación VI:GlySer cebador inverso	44
scFv oligo 3	SV63 scFv VL::VH orientación GlySer:Vh cebador directo	45
scFv oligo 4	SV63 scFv VL::VH orientación Vh:FLAG:His cebador inverso	46
scFv oligo 5	SV63 scFv VH::VL orientación PelB:Vh cebador directo	47
scFv oligo 6	SV63 scFv VH::VL orientación Vh:GlySer cebador inverso	48
scFv oligo 7	SV63 scFv VH::VL orientación GlySer:VI cebador directo	49
scFv oligo 8	SV63 scFv VH::VL orientación VI:FLAG:His cebador inverso	50

Para crear la secuencia V_L-conector [Gly₄Ser]₃-V_H scFv, se realizó una PCR en dos etapas. La primera etapa consistió en dos reacciones usando i) scFv oligos 1 y 2 (SEQ ID NOs: 43 y 44, respectivamente) y un clon pCRTOPBluntII SV63 V_L como molde para amplificar la mitad 5' de la construcción; ii) scFv oligos 3 y 4 (SEQ ID NOs: 45 y 46 respectivamente) y un clon pCRTOPBluntII SV63 V_H como molde para amplificar la mitad 3' de la construcción. La segunda etapa usó SOE para unir los dos fragmentos de (i) y (ii) por hibridación de sus extremos complementarios 3' y 5' (respectivamente) y extensión hasta el producto de longitud completa por la adición de polimerasa, con la amplificación posterior usando scFv oligos 1 y 4 (SEQ ID NOs: 43 y 46 respectivamente).

La secuencia V_H-conector [Gly₄Ser]₃-V_L scFv se creó en un método similar. La primera etapa consistió en dos reacciones usando i) scFv oligos 5 y 6 (SEQ ID NOs: 47 y 48 respectivamente) y un clon pCRTOPBluntII SV63 V_H como molde para amplificar la mitad 5' de la construcción; ii) scFv oligos 7 y 8 (SEQ ID NOs: 49 y 50,

respectivamente) y un clon pCARTOPOBluntII SV63 V_L como molde para amplificar la mitad 3' de la construcción. La segunda etapa usó SOE para unir los dos fragmentos de (i) y (ii) por hibridación de sus extremos complementarios 3' y 5' (respectivamente) y extensión hasta el producto de longitud completa por la adición de polimerasa, con la amplificación posterior usando scFv oligos 5 y 8 (SEQ ID NOs 47 y 50, respectivamente).

- 5 Las reacciones de la primera etapa se realizaron usando un kit Roche GC RICH y las condiciones del fabricante con tampón de resolución GC-RICH a una concentración de 0,5M en un volumen de reacción de 25µl. Las reacciones se realizaron en un Stratagene Robocycler con las condiciones de ciclación siguientes:

<u>Ciclo 1-2</u>	<u>Ciclo 3-27</u>	<u>Extensión final</u>
------------------	-------------------	------------------------

94°C 30 seg	94°C 30 seg	
-------------	-------------	--

10 54°C 30 seg	65°C 30 seg	
----------------	-------------	--

72°C 60 seg	72°C 60 seg	72°C 300 seg
-------------	-------------	--------------

Las muestras de las reacciones anteriores se analizaron en un gel 1% agarosa/TBE y se tiñeron con bromuro de etidio y revelaron que se habían producido los cuatro fragmentos de ADN esperados.

- 15 Las reacciones de la segunda etapa con SOE se realizaron mezclando las parejas de fragmentos apropiadas en cantidades aproximadamente iguales en reacciones del kit Roche GC RICH usando las condiciones del fabricante con tampón de resolución GC-RICH a una concentración de 0,5M en un volumen de 25µl. Las reacciones se realizaron usando las condiciones de ciclación en 2 etapas siguientes:-

Ciclo 1-2

94°C 30 seg

20 65°C 30 seg

72°C 60 seg

Esta reacción actúa como una extensión del cebador produciendo fusiones de longitud completa. Los cebadores oligonucleotídicos se añadieron para amplificar por PCR las moléculas de longitud completa usando las condiciones de ciclación siguientes.

- 25 Ciclo 3-15 Extensión final

94°C 30 seg

65°C 30 seg

72°C 60 seg 72°C 300 seg

- 30 Cuando las muestras de las reacciones con SOE anteriores se analizaron en un gel 1% agarosa/TBE y se tiñeron con bromuro de etidio, se mostró que ambas reacciones contenían fragmentos de ADN de aproximadamente 750 pb (el tamaño esperado).

- 35 Los productos de SOE se aislaron y se purificaron usando los kits GeneClean Spin y se clonaron en pCARTOPO BluntII (Invitrogen). Para cada producto de SOE (V_H->V_L y V_L->V_H) se caracterizó completamente un clon TOPO por secuenciación de ADN. Se crearon construcciones de expresión pDGF (pDGF-SV63-VHVL y pDGF-SV63-VLVH) por la escisión de las secuencias scFv de pCARTOPOBluntII usando NdeI y EcoRI, y ligación posterior en la estructura de ADN del vector pDGF preparado de manera similar. También se generaron construcciones de expresión pIMS147 (pIMS-SV63-VHVL y pIMS-SV63-VLVH) por escisión de las secuencias scFv de pCARTOPOBluntII usando NcoI y EcoRI, y ligación posterior en la estructura de ADN del vector pIMS147 preparado de manera similar. Las reacciones de ligación se transformaron en células de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante y se identificaron los transformantes. Los clones correctos pIMS147-SV63 scFv y pDGF-SV63 scFv se identificaron por análisis de la secuencia del ADN para confirmar el mantenimiento del marco de lectura y la exactitud de la secuencia.

2.5.5 Expresión de Proteína scFv Recombinante en *E. coli*

- 45 Los clones TOP 10 pIMSSV63-scFv de *E. coli* se ensayaron para la expresión de proteína scFv soluble según las directrices descritas por Charlton (en "Antibody Engineering: methods & protocols" p 245-254, Ed. B.K.C. Lo, Humana Press, 2004). Brevemente, se usaron cultivos de toda la noche de clones seleccionados para inocular 500ml de 2TY(amp/glu) (16g Bacto-peptona/ 5g Extracto de levadura/ 5g NaCl/ 2% (p/v) glucosa en 1 litro, pH 7,5, + 100µg/ml ampicilina) en matraces de 2,5l, que se incubaron a 37°C y 250rpm hasta que la DO₆₀₀ alcanzó

aproximadamente 0,8. En este momento, las células se recogieron por centrifugación a 3.000g y se transfirieron a 500ml frescos de 2TY(amp/suc) (16g Bacto-peptona/ 5g Extracto de levadura/ 5g NaCl/ 0,4M sacarosa en 1 litro, pH 7,5, + 100µg/ml ampicilina) en matraces de 2,5l. La incubación comenzó a 30°C y 250rpm durante 1 hora, antes de la adición de IPTG hasta una concentración final de 1mM.

La incubación se continuó durante 16 horas más y en ese punto las células y el medio se recogieron y analizaron para la presencia de scFv recombinante usando procedimientos de SDS-PAGE y transferencia Western. El análisis Western usando el anticuerpo anti-FLAG M2-HRP (Sigma) en combinación con disolución de sustrato cromogénico BM POD (Roche) indicó buenos niveles de expresión de la proteína recombinante (del peso molecular esperado de aproximadamente 30kDa) tanto en muestras de lisado celular soluble como de medio para ambas orientaciones del scFv.

La proteína scFv recombinante se purificó usando cromatografía en columna IMAC y se ensayó para funcionalidad por competición con Mab SV63 parental por la unión al antígeno en un ensayo inmunocitoquímico usando células Caco2Bbel (CRL-2102, American Type Culture Collection). Se observó que ambas orientaciones del scFv inhibían la unión del Mab SV63 parental a las superficies celulares, lo que indica el mantenimiento de la superficie de unión al antígeno en el scFv preparado por ingeniería.

EJEMPLO 3 PURIFICACIÓN DEL ANTICUERPO

3.1 Preparación de columnas de afinidad del péptido

Para la purificación de anticuerpos específicos de péptido a partir de sueros policlonales, se producen columnas de afinidad de péptido. Dependiendo del resto N terminal del péptido, se usó uno de dos métodos para la preparación de la columna. Éstos usaron gel de acoplamiento SulfoLink o AminoLink como la matriz de afinidad.

El gel de acoplamiento SulfoLink (Perbio) permite la inmovilización covalente de péptidos que contienen sulfidrilos a un soporte de gel de agarosa para usarse en procedimientos de purificación por afinidad. Los RSPE se acoplan a este gel usando un protocolo suministrado por el fabricante y resumido a continuación.

Se equilibran 10ml de suspensión del gel SulfoLink (volumen de lecho del gel, 5ml) a temperatura ambiente. La suspensión del gel se vierte en una columna y se equilibra con 20ml de tampón de acoplamiento (50mM Tris, 5mM EDTA pH8,5) (Sigma). Se disuelve 1mg de péptido sintético en 5ml de tampón de acoplamiento y se añade a la columna. La columna se sella y se incuba a temperatura ambiente con mezclado por inversión durante 15 minutos y se deja que el gel se asiente durante 30 minutos. Se deja que el exceso de tampón se elimine por drenaje, antes de lavar la columna con 15ml de tampón de acoplamiento. Los sitios de unión no específica se bloquean con 5ml de 50mM hidrocloreto de L-cisteína (Sigma) en tampón de acoplamiento. La columna se sella y se incuba con y sin mezclado, como se ha descrito anteriormente. La columna se lava con 30ml de 1M cloruro de sodio (Sigma) y se prepara para almacenamiento aplicando 10ml de PBS pH 7,2 desgaseado que contiene 0,05% azida sódica (Sigma). La columna acoplada se almacena a 4°C.

El gel de acoplamiento AminoLink (Perbio) permite la inmovilización covalente de péptidos a través de la amina primaria a un soporte de gel de agarosa para usarse en procedimientos de purificación por afinidad. Los RSPE se acoplan a este gel usando un protocolo suministrado por el fabricante y resumido a continuación.

Se equilibran 10ml de suspensión del gel AminoLink (volumen de lecho del gel, 5ml) a temperatura ambiente. La suspensión del gel se vierte en una columna y se equilibra con 20ml de tampón de acoplamiento (0,1M fosfato de sodio, pH7,5, 0,05% azida sódica). Se disuelve 1mg de péptido sintético en 5ml de tampón de acoplamiento. Se añaden 250µl de 1M cianoborohidruro de sodio preparado en 0,01 M hidróxido sódico (Sigma) a la disolución del péptido, que se vierte en la columna. La columna se sella y se incuba a temperatura ambiente con mezclado por inversión durante 6 horas. Se deja que la columna se asiente y se elimina el sobrenadante. Se añaden 5ml de 1M Tris-HCl pH7,4 (Sigma) y 250ul de 1M cianoborohidruro de sodio preparado en 0,01 M hidróxido sódico. La columna se sella y se incuba a temperatura ambiente con mezclado por inversión durante 30 minutos. La columna se lava con 30ml de 1M cloruro de sodio y se prepara para almacenamiento aplicando 10ml de PBS desgaseado que contiene 0,05% azida sódica. La columna acoplada se almacena a 4°C.

3.2 Purificación de anticuerpos específicos de péptido a partir de sueros policlonales

Los sueros de conejo policlonales se centrifugan a 2.500x g durante 10 minutos, se filtran usando membranas de 0,45 micrómetros y se diluyen 1:1 con PBS. Se deja que la columna de afinidad del péptido alcance temperatura ambiente y se equilibra con 4 volúmenes de columna de PBS. Se añade una disolución de suero preparada a la columna reaplicándose el caudal que pasa a la columna. La columna se lava con 6 volúmenes de columna de PBS. El anticuerpo específico del péptido se eluye aplicando 0,1M glicina-HCl pH3,0 (Sigma) a la columna y recogiendo fracciones de 1ml en tubos que contienen 0,1ml de 1M Tris-HCl pH8,0. Las fracciones que contienen la proteína se identifican por absorbancia a 280nm y se combinan. El anticuerpo purificado se dializa en PBS usando un casete Slide-a-Lyser con un punto de corte de peso molecular de 10.000 (Perbio) y se almacena a -20°C. Mientras tanto, la

columna se regenera con 3 volúmenes de columna de 0,1 M glicina-HCl pH2,5, seguido de 8 volúmenes de columna de PBS.

3.2 Purificación de anticuerpos monoclonales

5 IgG monoclonal se purifica a partir del sobrenadante del cultivo por cromatografía de afinidad con proteína G usando una columna HiTrap de proteína G HP de 1ml (GE Healthcare). El sobrenadante del cultivo se centrifuga a 2.500x g durante 10 minutos y se filtra usando membranas de 0,45 micrómetros antes de usarse. La velocidad de caudal máxima es 1 ml/minuto en todo momento. La columna se equilibra con 10 volúmenes de columna de PBS pH 7 y la muestra se carga. La columna se lava con 10 volúmenes de columna de PBS. El anticuerpo se eluye aplicando 0,1M glicina-HCl pH3,0 (Sigma) a la columna y recogiendo fracciones de 1ml en tubos que contienen 0,1ml de 1M Tris-HCl pH8,0. Las fracciones que contienen la proteína se identifican por absorbancia a 280nm y se combinan. El anticuerpo purificado se dializa en PBS usando un casete Slide-a-Lyser con un punto de corte de peso molecular de 10.000 (Perbio) y se almacena a -20°C. Mientras tanto, la columna se regenera con 10 volúmenes de columna de 0,1M glicina pH2,5, se lava con 10 volúmenes de columna de PBS y se almacena en 20% etanol a 4°C.

EJEMPLO 4 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS

15 4.1 Titulación de los anticuerpos anti-péptido por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Los sueros obtenidos de conejos, ratones o hámsters inmunizados con conjugados de péptido se ensayan por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) para determinar la magnitud relativa de las respuestas de anticuerpo, tomando como base los métodos descritos por Engvall E., y Perlmann P. *Immunochemistry* 8, 871-874 (1971); Harlow E. *et al*, *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 p. 182-183.

20 Se añaden disoluciones de péptido a 2µg/ml en 35mM bicarbonato de sodio, 15mM carbonato de sodio pH 9,5 a 100µl/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos y se incuban durante al menos cuatro horas a 4°C. Las placas se lavan tres veces con PBS, 0,05% Tween 20 (PBST) (Sigma). Los sitios de unión restantes se bloquean con 200µl/pocillo de PBS que contiene 1% polvo de leche desnatada (Marvel, Premier Foods, St Albans) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar como anteriormente, se añade PBST a las placas a 100µl/pocillo. Se añaden diluciones iniciales de suero en pocillos en duplicado en la columna 1 y diluidos dos veces en todos los pocillos de la placa, dejando los pocillos de la columna 12 sólo con PBST. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar varias veces como anteriormente, las placas se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo conjugado anti-especie apropiado diluido a 1/10.000 en PBST.

30 Las muestras de sueros de conejo se incuban con conjugado IgG anti-conejo de cabra peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma); los sueros de hámster con conjugado de IgG anti-hámster sirio de conejo HRP (Stratec, Soham, Cambridgeshire) y las muestras de suero de ratón se incubarán tanto con conjugado IgG anti-ratón de conejo HRP (Sigma) como con conjugado fragmento Fc de IgG anti-ratón de cabra HRP (Sigma). La disolución del sustrato se prepara diluyendo una pastilla que contiene 1mg de dihidrocloruro de 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (Sigma) en 10ml de 24mM ácido cítrico, 60mM fosfato de sodio pH 5,0 y añadiendo 2µl de disolución al 30% de peróxido de hidrógeno (Sigma). Después de lavar más, se añade disolución fresca de sustrato a las placas a 100µl/pocillo y se dejan las placas en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. El desarrollo de color resultante se para por la adición de 50µl/pocillo de 3M ácido sulfúrico. La densidad óptica de la placa se lee a 450nm usando un lector de placas de microtitulación.

40 4.2 Resultados del ELISA

4.2.1 Anti-sueros Policlonales de Conejos

45 Los sueros tomados después de la tercera dosis de conejos inmunizados con los RSPE de las proteínas diana siguientes (véase el Ejemplo 2.1 anterior) Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata, CD 155 de rata (PVR - receptor de poliovirus; Tage4), GTR2 de rata, CFTR de rata, CNT2 de rata, MDR1 de rata, MDR1 de ratón, sucrasa-isomaltasa de rata, GLUT 7 de ratón, GTR5 de rata, OATP-B de rata, GCC de rata, PLB de rata, LPH de rata, AMPN de rata, MCDL de rata, y SCAB de rata se ensayaron por ELISA de péptidos como se ha descrito en el Ejemplo 4.1 anterior. Los sueros de ensayo y preinmunes de cada conejo se ensayaron por titulación frente a su péptido de inmunización. La respuesta inmune se evaluó calculando los valores de titulación del 50% de unión (dilución requerida para reducir la señal máxima al 50%). Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6 Resultados de ELISA que muestran que se han generado anticuerpos policlonales de conejo frente a los RSPE especificados.

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Suero	Titulación del 50% de unión (veces de dilución)
Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	SEQ ID NO: 1	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	>500,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	>500,000
Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	SEQ ID NO: 2	Conejo 1 (pre- inmune)	- 33,000
		Conejo 1 (ensayo)	-
		Conejo 2 (pre- inmune)	5000
		Conejo 2 (ensayo)	
CD 155 de rata (PVR, Tage4)	SEQ ID NO: 3	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	15,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	5,000
Transportador de glucosa GTR2 (GLUT2) de rata	SEQ ID NO: 4	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	55,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	40,000
Transportador de cloro CFTR de rata	SEQ ID NO: 5	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	95,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Suero	Titulación del 50% de unión (veces de dilución)
		Conejo 2 (ensayo)	44,000
Transportador de nucleósidos CNT2 de rata	SEQ ID NO: 6	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	50,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	50,000
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de rata	SEQ ID NO: 8	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	35,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	64,000
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de ratón	SEQ ID NO: 9	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	41,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	8,000
Sucrasa- isomaltasa de rata	SEQ ID NO: 10	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	31,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-
		Conejo 2 (ensayo)	7,000
Transportador de glucosa GLUT7 de ratón	SEQ ID NO: 11	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	11,000
		Conejo 2 (pre- inmune)	-

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Suero	Titulación del 50% de unión (veces de dilución)
		inmune)	34,000
		Conejo 2 (ensayo)	
Transportadores de glucosa GLUT7 de ratón/GTR5 (GLUT5) de rata	SEQ ID NO: 12	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	30,000
		Conejo 2 (pre-inmune)	
		Conejo 2 (ensayo)	34,000
Polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP-B (SLC21A9) de rata	SEQ ID NO: 15	Conejo 1 (pre- inmune)	-
		Conejo 1 (ensayo)	66,000
		Conejo 2 (pre-inmune)	
		Conejo 2 (ensayo)	12,000
GCC (guanilil ciclasa) de rata	SEQ ID NO: 27	pre-inmune ensayo	- 90,000
PLB (fosfolipasa B) de rata	SEQ ID NO: 28	pre-inmune ensayo	- 170,000
LPH (lactasa-florizin hidrolasa) de rata	SEQ ID NO: 29	pre-inmune ensayo	- 35,000
AMPN (aminopeptidasa N) de rata	SEQ ID NO: 31	pre-inmune ensayo	- 220,000
MCDL de rata (proteína semejante a mucina y cadherina) de rata	SEQ ID NO: 32	pre-inmune ensayo	- 16,000
SCAB (subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida) de rata	SEQ ID NO: 34	pre-inmune ensayo	- 18,000

Los sueros de cada uno de los sangrados de ensayo se purificaron por afinidad como se ha descrito en el Ejemplo 3.2 y se ensayaron por ELISA como se ha descrito anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7 Resultados de ELISA para anticuerpos purificados por afinidad obtenidos de sueros de ensayo de conejo.

RSPE de Inmunización	Muestra de suero	Volumen de Elución (ml)	Concentración del Eluato (mg/ml)	Titulación del 50% de unión (veces de dilución)
SEQ ID NO: 1	Conejo 1	10	0.47	1 x 10 ⁷
	Conejo 2	10	0.47	930,000
SEQ ID NO: 2	Conejo 1	3.5	0.08	32,000
	Conejo 2	2	0.12	3,000
SEQ ID NO: 3	Conejo 1	3	0.25	8,000
	Conejo 2	3.5	0.26	6,000
SEQ ID NO: 4	Conejo 1	7.25	0.14	18,000
	Conejo 2	4	0.21	5,000
SEQ ID NO: 5	Conejo 1	5.5	0.72	51,000
	Conejo 2	4.5	0.32	19,000
SEQ ID NO: 6	Conejo 1	7	0.52	47,000
	Conejo 2	6	0.35	16,000
SEQ ID NO: 8	Conejo 1	5.5	0.64	42,000
	Conejo 2	9	0.65	31,000
SEQ ID NO: 9	Conejo 1	5	0.26	33,000
	Conejo 2	3.25	0.20	8,000
SEQ ID NO: 10	Conejo 1	6	0.35	16,000
	Conejo 2	4.5	0.16	2,000
SEQ ID NO: 11	Conejo 1	5.5	0.66	7,000
	Conejo 2	9	0.94	7,000
SEQ ID NO: 12	Conejo 1	8	0.23	30,000
	Conejo 2	5	0.09	34,000
SEQ ID NO: 15	Conejo 1	9.5	0.31	66,000
	Conejo 2	6	0.19	12,000
SEQ ID NO: 27	Conejo 1	6	0.29	20,000
SEQ ID NO: 28	Conejo 1	6	0.66	19,000
SEQ ID NO: 29	Conejo 1	6	0.20	12,000
SEQ ID NO: 31	Conejo 1	7	0.18	10,000
SEQ ID NO: 32	Conejo 1	3	0.16	8,000
SEQ ID NO: 34	Conejo 1	5	0.18	5,000

Los sangrados recogidos de conejos inmunizados con el RSPE del transportador de nucleósidos CNT2 de rata también se purificaron por afinidad y se ensayaron por ELISA. El sangrado recogido del conejo 1 se eluyó en 36,5ml a una concentración de 0,86 mg/ml y la titulación del 50% de unión se ensayó en 1 en 47,000. El sangrado recogido del conejo 2 se eluyó en 27,5ml a una concentración de 0,57 mg/ml y la titulación del 50% de unión se ensayó en 1 en 44,000.

Los anticuerpos policlonales purificados por afinidad del conejo 1 se purificaron adicionalmente usando una columna de Proteína A (Amersham), se dializaron frente a disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se ensayaron por ELISA. Esto resultó en 13ml de IgG policlonal purificada adicionalmente frente al RSPE obtenido de CNT2 (SEQ ID NO: 6), que tenía una concentración de 1,97 mg/ml y una titulación del 50% de unión de 1 en 90,000.

4.2.2 Anti-sueros Policlonales de Ratones

Los sueros tomados después de la tercera dosis de ratones inmunizados con los RSPE de las proteínas diana siguientes (véase el Ejemplo 2.2 anterior) Transportador de oligopéptidos PepT1 de rata, CD 155 de rata (PVR - receptor de poliovirus; Tage4), GTR2 de rata, CFTR de rata, CNT2 de rata, MDR1 de rata, MDR1 de ratón, sucrasa-isomaltasa de rata, GLUT 7 de ratón, GCC de rata, PLB de rata y LPH de rata, se ensayaron por ELISA de péptido como se ha descrito en el Ejemplo 4.1 anterior. Los sueros de ensayo de cada ratón se ensayaron por titulación frente al péptido de inmunización. La respuesta inmune se evaluó calculando los valores de titulación del 50% de unión (dilución requerida para reducir la señal máxima al 50%). Los resultados se resumen en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8 Resultados de ELISA que muestran que se han generado anticuerpos policlonales de ratón frente a los RSPE especificados.

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Muestra de suero de ratón	Titulación del 50% de Unión (veces de dilución)
Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	SEQ ID NO: 1	1	>100,000
		2	70,000
		3	70,000
		4	>100,000
Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	SEQ ID NO: 2	1	-
		2	10,000
		3	-
		4	-
CD155 de rata (PVR, Tage4)	SEQ ID NO: 3	1	3,000
		2	62,000
		3	41,000
		4	-
Transportador de glucosa GTR2 (GLUT2) de rata	SEQ ID NO: 4	1	2,000
		2	2,000
		3	-
		4	-
		5	-
		6	7,000

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Muestra de suero de ratón	Titulación del 50% de Unión (veces de dilución)
		7	7,000
		8	4,000
Transportador de cloro CFTR de rata	SEQ ID NO: 5	1	40,000
		2	40,000
		3	26,000
		4	3,000
		5	-
		6	-
		7	2000
		8	-
Transportador de nucleósidos CNT2 de rata	SEQ ID NO: 6	1	20,000
		2	3,500
		3	19,000
		4	60,000
		5	—
		6	2,000
		7	1,500
		8	2,000
		9	2,000
		10	2,000
		11	32,000
		12	15,000
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de rata	SEQ ID NO: 8	1	1,000
		2	18,000
		3	77,000
		4	-
Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de ratón	SEQ ID NO: 9	1	12,000
		2	12,000
		3	4,000
		4	4,000
Sucrasa-isomaltasa de rata	SEQ ID NO: 10	1	3,000

PROTEÍNA FUENTE	RSPE de Inmunización	Muestra de suero de ratón	Titulación del 50% de Unión (veces de dilución)
		2	7,000
		3	7,000
		4	2,000
Transportador de glucosa GLUT7 de ratón	SEQ ID NO: 11	1	4,000
		2	2,000
		3	1,000
		4	2,000
		5	-
		6	-
		7	-
		8	-
GCC (guanilil ciclasa) de rata	SEQ ID NO: 27	1	2,500
		3	2,000
		4	-
		5	2,000
		6	2,000
		7	6,000
		8	2,000
PLB (Fosfolipasa B) de rata	SEQ ID NO: 28	1	1,500
		2	
		3	1,000
		4	-
		5	-
		6	-
		7	-
		8	-
LPB (lactasa-florizin hidrolasa) de rata	SEQ ID NO: 29	1	1,500
		2	3,000
		3	3,000
		4	12,000
		5	15,000
		6	15,000

7	15,000
8	15,000

4.2.3 Anticuerpos monoclonales frente a un RSPE del transportador de oligopéptido PepT1 de rata

Se purificaron por afinidad como se ha descrito en el Ejemplo 3.2, 40ml del sobrenadante de cultivo de cada una de las siete líneas celulares monoclonales positivas que producen anticuerpos frente al RSPE que tiene SEQ ID NO 1 (véase el Ejemplo 2.3 anterior) y se ensayó por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 4.1 anterior. Los anticuerpos monoclonales purificados se ensayaron por titulación frente al péptido de inmunización (SEQ ID NO: 1). La respuesta inmune se evaluó calculando los valores de titulación del 50% de unión (dilución requerida para reducir la señal máxima al 50%). Los resultados se resumen en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9 Resultados de ELISA para el sobrenadante de cultivo purificado por afinidad de líneas celulares de hibridoma generadas a partir de ratones inmunizados con un RSPE del transportador de oligopéptido PepT1 de rata.

Línea Celular de Hibridoma	Volumen de Elución (ml)	Concentración (mg/ml)	Titulación del 50% de Unión (veces de dilución)
1645.142.002	3	1,4	300,000
1644.112.040	4	1,1	12,500
1645.451.209	2	0.1	-
1647.372.245	3	1,2	92,000
1646.461.144	2	0.08	-
1647.449.047	2	0.09	-
1646.240.206	2	0.1	-

Las líneas celulares de hibridoma 1645.142.002, 1644.112.040 y 1647.372.245 producen claramente anticuerpos monoclonales que reconocen el RSPE que tiene la secuencia de SEQ ID NO 1, que se obtiene de PepT1 de rata.

4.2.4 Anticuerpos monoclonales frente a un RSPE del transportador GLUT7 de ratón

Se purificaron por afinidad como se ha descrito en el Ejemplo 3.2, 40ml del sobrenadante de cultivo de cada una de las cuatro líneas celulares monoclonales positivas que producen anticuerpos frente al RSPE que tiene SEQ ID NO 11 (véase el Ejemplo 2.3 anterior) y se ensayó por ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 4.1 anterior. Los anticuerpos monoclonales purificados se ensayaron por titulación frente al péptido de inmunización (SEQ ID NO: 11). La respuesta inmune se evaluó calculando los valores de titulación del 50% de unión (dilución requerida para reducir la señal máxima al 50%). Los resultados de dos de los cuatro anticuerpos monoclonales anti-GLUT7 se resumen en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10 Resultados de ELISA para el sobrenadante de cultivo purificado por afinidad de líneas celulares de hibridoma generadas a partir de ratones inmunizados con un RSPE del transportador GLUT7 de ratón.

Línea Celular de Hibridoma	Volumen de Elución (ml)	Concentración (mg/ml)	Titulación del 50% de Unión (veces de dilución)
1657.183.245.233	2,5	0.86	1,500
1657.120.223.282	2.75	0.59	4,000

4.3 Inmunohistoquímica de secciones de tejido intestinal de roedores

El tejido intestinal de rata se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso. Todo el tejido se seccionó en un criostato a -20°C y el tejido se puso en portas cargados positivamente, se fijaron en acetona helada durante 10 min y se dejó que se secaran al aire. Los portas se almacenaron a -20°C y se usaron en 1 mes después del seccionamiento. Antes de empezar la inmunohistoquímica, se dejó que todos los portas se calentaran hasta temperatura ambiente. Se cargaron en el Sequenza, para realizar IHC manual. Todos los portas se

- 5 bloquearon para peroxidasas endógenas por aplicación de bloqueo de peroxidasa (proporcionado en un kit Dako Envision®) durante 6 min a temperatura ambiente. Los portas se lavaron en disolución salina tamponada con TRIS (10mM) con tween 20 (0,1%) (TBST) durante 5 min. Las proteínas no específicas se bloquearon por adición de 5% proteína de leche (Marvel™) durante 30 min a temperatura ambiente. Los portas se lavaron durante 5 min en TBST. Se aplicó el anticuerpo primario (preparado en TBST con 1% Marvel™, a las diluciones indicadas en la tabla) y los portas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portas se lavaron en TBST (2 x 5min). Se aplicó polímero Envision® de conejo y se incubó en los portas durante 30 min a temperatura ambiente. Los portas se lavaron (2 x 5 min) en TBST. Se aplicó DAB durante 5 min a temperatura ambiente. Los portas se lavaron en H₂O destilada, se deshidrataron mediante alcoholes graduados y xileno y se montaron en DPX.

Tabla 11 Resumen de los datos inmunohistoquímicos para anticuerpos policlonales de conejo producidos frente a RSPE específicos

SEQ ID NO de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución de anticuerpo a la que estaba presente la tinción	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
1	Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	1:20- 1:200	1:50	Tinción de células epiteliales de la vellosidad (inconsistente)	Tinción de células epiteliales de la vellosidad (inconsistente)	Sin tinción	Tinción de células epiteliales de la vellosidad (inconsistente)	Datos de bloqueo no concluyentes
2	Transportador de oligopéptido PepT1 de rata	1:10 - 1:200		Sin tinción	Sin tinción			
3	CD 155 de rata (PVR, Tage4)	1:10 - 1:200		Tinción de la lámina propia (no específica)	Tinción de la lámina propia (no específica)			
4	Transportador de glucosa GTR2 (GLUT2)	de 1:10 - 1:200	1:10	Células epiteliales de la cripta, tinción de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la cripta	

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
irregular de las células epiteliales de la vellosidad								
5	Transportador de cloro	de 1:25 - 1:200	1:50	Tinción de las células epiteliales de la vellosidad y de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la vellosidad y bloqueada con éxito células	Tinción de las células epiteliales de la cripta	La tinción fue
	CFTR							
	de rata			epiteliales de la cripta	epiteliales de la cripta	epiteliales con exceso de péptido		
6	Transportador nucleósidos	de 1:25 - 1:200	1:50	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	La tinción fue
	CNT2							
	de rata							

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
				epiteliales vellosidad y de la cripta	de la epiteliales vellosidad y de la cripta	epiteliales vellosidad y de la cripta		
8	Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de rata	1:10 - 1:200		Sin tinción	Sin tinción			
9	Transportador de resistencia a múltiples fármacos MDR1 de ratón	1:10 - 1:200		Sin tinción	Sin tinción			
10	Sucrasa- isomaltasa de rata	1:10 - 1:200		Sin tinción	Sin tinción			

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
11	Transportador de glucosa GLUT7 de ratón	1:25-1:200	1:50	Tinción en las Glándulas de Brunner	Tinción de células epiteliales de cripta	Tinción de células epiteliales de cripta	Tinción de las células epiteliales de la bloqueada con éxito	La tinción fue con exceso de péptido
12	Transportadores de glucosa GLUT7 de ratón/GTR5 (GLUT5) de rata	1:10 - 1:200		Sin tinción	Sin tinción			
15	Polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP-B	1:10 - 1:200		Posible tinción del epitelio				

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
(SLC21A9) de rata								
27	GCC de rata (guanilil ciclasa)	1:25 - 1:200	1:25	Tinción de células epiteliales de cripta y células epiteliales de la vellosidad	Tinción de células epiteliales de cripta y células epiteliales de la vellosidad	Tinción de células epiteliales de la vellosidad	Tinción de las células epiteliales de la cripta y de la vellosidad	La tinción fue bloqueada con éxito con exceso de péptido
28	PLB de rata (Fosfolipasa B)	1:25 - 1:200	1:50	Tinción de células epiteliales de la vellosidad y de la cripta	Tinción de células epiteliales de la vellosidad y de la cripta	Tinción de células epiteliales de la vellosidad y de la cripta	Tinción de las células epiteliales de la vellosidad y de la cripta	La tinción no fue bloqueada con éxito con exceso de

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
péptido - lo que indica que se observa tinción no específica								
29	LPH (lactasa-florizín hidrolasa) de rata	1:25-1:200	1:25	Posible tinción de células epiteliales de la cripta y de la vellosidad	Posible tinción de células epiteliales de la cripta y de la vellosidad	Sin tinción	Sin tinción	Tinción en duodeno y yeyuno bloqueada con con éxito con exceso de péptido
31	AMPN (aminopeptidasa N) de rata	1:25-1:200		Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	

SEQ ID NO	Proteína Fuente	Intervalo de dilución	Dilución	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Ileo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con
de RPSE frente al que se produjo el anticuerpo			de anticuerpo a la que estaba presente la tinción					péptido de bloqueo
32	MCDL de rata (mucina y proteína semejante a cadherina)	1:25-1:200		Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	
34	SCAB de rata (subunidad beta del canal de sodio sensible a amilorida)	1:25-1:200		Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	Sin tinción	

La tinción específica se evaluó con el uso de péptidos bloqueantes. Los anticuerpos primarios, a la dilución que proporciona una tinción óptima, se incubaron con un exceso de 10 veces de péptido durante 2 horas a temperatura ambiente en TBS con 1% Marvel™, antes de la aplicación en los portas lo que resta de protocolo es como se ha descrito anteriormente. Los resultados se resumen en la Tabla 11 anterior.

5 EJEMPLO 5 PRODUCCIÓN DE TOXINAS PROTEICAS RECOMBINANTES

5.1 Producción de gelonina recombinante

El gen que codifica la proteína gelonina de 251 aminoácidos (véase Nolan *et al.*, 1993, Gene 134: 223-227) junto con la secuencia líder *pelB* y una etiqueta C terminal de hexa-histidina se optimizaron por codones para la expresión en *E.coli* y se clonaron en un vector de expresión de *E. coli* (pDGF - obtenido del vector NEB pMALc-2, pDGF contiene todas las características de pMALc-2 excepto la secuencia que codifica la proteína de unión a la maltosa, que se ha escindido) bajo el control del promotor híbrido *tac*. El vector recombinante se transformó en la cepa de *E. coli* TOP10.

La expresión de la gelonina se consiguió creciendo las células TOP10 transformadas en medio LB con inducción a 28°C con 1mM IPTG durante 20 horas. Después de recoger las células de *E.coli*, las células se rompieron usando una prensa de células French (Constant Systems; rotura a 20.000psi) en 1xPBS/30mM Imidazol. El extracto soluble se aplicó en una columna GraviTrap (GE Healthcare) y después de un lavado con 15ml de 1xPBS/30mM Imidazol, la gelonina se eluyó en 1xPBS/500mM Imidazol. Como una segunda etapa de purificación, el eluato se desaló en 20mM tampón de fosfato de sodio pH 8,0 y se aplicó en una columna de intercambio catiónico Resource S con una elución en gradiente de sal de 0 a 1M.

Para determinar si la gelonina recombinante era activa (funcional), la proteína gelonina purificada se ensayó en un ensayo de inhibición de la traducción de proteínas (TNT T7 sistema rápido acoplado de transcripción/traducción, Promega) usando ADN de luciferasa T7 como sustrato. Como control positivo, se usó cicloheximida. Esto demostró que la gelonina purificada recombinante inhibía la traducción del ADN de luciferasa T7.

5.2 Producción de VIP2A recombinante

El gen que codifica la proteína VIP2A de 464 aminoácidos (véase EEUU 5.849.870) junto con una etiqueta C terminal de hexa-histidina se optimizó por codones para la expresión en *E. coli* y se clonó en el vector de expresión pET24a (Novagen). El vector recombinante se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3).

La expresión de VIP2A se consiguió creciendo las células BL21(DE3) transformadas en medio LB con inducción a 28°C con 1mM IPTG durante 20 horas. Después de la recogida, las células se rompieron usando una prensa de células French como se ha descrito en el Ejemplo 5.1 anterior. El extracto soluble se aplicó en una columna HisTrapHP (GE Healthcare) y después de lavar con 5 volúmenes de columna de PBS/20mM imidazol, la proteína VIP2A se eluyó con un gradiente de hasta 500mM imidazol.

El análisis por SDS-PAGE del extracto soluble y la muestra de la purificación reveló una banda del tamaño esperado para la VIP2A con etiqueta de histidina producida de manera recombinante.

5.3 Construcción de expresión para la producción de Granzima B recombinante

Un gen que codifica la proteína Granzima B madura de 228 aminoácidos de rata (véase el No de registro de Genbank M34097 para información de la secuencia) se sintetizó artificialmente (fragmento de ADN 050031) y se clonó en pCR-Script para proporcionar el plásmido p050031. Se realizó un método de PCR anidada para introducir la secuencia que codifica la Granzima B en el vector de expresión pET32a(+) (Novagen).

La secuencia que codifica la Granzima B madura de p050031 se amplificó por PCR usando los cebadores RoPro070 petEKAGrZB F1 (SEQ ID NO: 51) y RoPro067 rGrzB R (SEQ ID NO: 52) para introducir una cola 5' homóloga al sitio de enteroquinasa presente en la etiqueta de fusión en pET32a(+). El producto de PCR resultante se usó como molde para la segunda parte de la PCR anidada, que se realizó usando los cebadores RoPro076 petEK/rGrzB F2 (SEQ ID NO: 53) y RoPro067rGrzB R (SEQ ID NO: 52) para introducir un sitio *KpnI* en 5'.

El producto final de PCR se digirió con *KpnI*/NotI y se ligó en pET32a(+) digerido de manera similar para proporcionar el vector de expresión pET32a(+):rGrzB. Esto resulta en una fusión limpia entre la etiqueta de expresión N terminal del vector del anfitrión y la secuencia que codifica la Granzima B recombinante, permitiendo así la activación de la Granzima B recombinante por tratamiento con enteroquinasa después de la expresión. El vector de expresión final pET32a(+):rGrzB puede transformarse en cualquier anfitrión de expresión de *E. coli* adecuado (p. ej. RosettaGami (DE3)).

Las secuencias de los cebadores usados en la construcción de pET32a(+):rGrzB son como sigue (todas las secuencias de los cebadores se proporcionan 5' a 3'): RoPro070 petEK/rGrzB F1 (SEQ ID NO: 51) GGTACCGACGACGACGACAAGATCATCGGTGGTCACGAAGCT AAGCCAC; RoPro067 rGrzB R (SEQ ID NO: 52)

AGCTGGCGGCCCGCCTAGGAC; RoPro076 petEK/rGrzB F2 (SEQ ID NO: 53)
AGATCTGGGTACCGACGACGACGA C.

EJEMPLO 6 CONJUGACIÓN DE LOS COMPONENTES DE ANTICUERPO CON TOXINAS

6.1 Conjugación de gelonina disponible comercialmente con anticuerpos policlonales anti-CNT2 de rata

5 La estrategia elegida para realizar este procedimiento es activar el anticuerpo con el agente de entrecruzamiento SPDP (N-succinimidil 3-[2-piridilditio]propionato; Pierce Chemical Co.) que formará puente disulfuro con la toxina tiolada. El método usado proviene de; Hermanson 1996 "Bioconjugate Techniques" (Academic Press p. 509) que indica que la conjugación no interferirá con la actividad de la toxina gelonina (30kDa). Se usaron relaciones molares de 5:1 y 10:1 de gelonina a anticuerpo policlonal anti-CNT2 para obtener la mezcla de reacción más eficaz.

10 6.1.1 Tratamiento con SPDP del anticuerpo policlonal CNT2

Se concentró una alícuota de 1ml de la IgG policlonal del conejo 1 purificada con proteína A (véase el Ejemplo 4.2.1, el sangrado recogido del conejo 1 se purificó por afinidad y se purificó usando una columna de Proteína A) usando un concentrador centricon con un punto de corte de 10kDa. Los 160µl resultantes se prepararon hasta una disolución de 10mg/ml en PBS 10mM EDTA pH 8. Se añadieron 6µl SPDP (3mg/ml en DMF) a 200µl de disolución de anticuerpo y se incubó durante 30min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de desalado PD10 equilibrada con PBS + 10mM EDTA pH 8. Todo el volumen de 3,5ml de muestra se recogió y se concentró usando un concentrador centricon para obtener anticuerpo anti-CNT2 tratado con SPDP a una concentración final de 3,6mg/ml.

6.1.2 Tiolación de la gelonina

20 La gelonina se obtuvo de Aczon SpA como una muestra de 5 mg de proteína liofilizada purificada a partir de semillas de *Gelonium multiflorum*. La muestra se disolvió inicialmente en PBS a una concentración de 5 mg/ml. Se concentraron 300µl de esta disolución en un concentrador centricon y el volumen se redujo hasta 55µl.

Esto se diluyó en 50mM trietanolamina 10mM EDTA pH 8 para proporcionar una disolución de gelonina de 10 mg/ml. Se disolvió 2-inmunotiolano para proporcionar una disolución de 20mg/ml en agua destilada. Se añadieron 10,5µl de la disolución de 2-inmunotiolano a 150µl de disolución de gelonina y la mezcla se incubó en hielo durante una hora. La gelonina activada se aplicó a una columna de desalado PD10 equilibrada con PBS + 10mM EDTA pH 8. Todo el volumen de 3,5ml de muestra se recogió y se concentró en un concentrador centricon para obtener gelonina tiolada a una concentración final de 3mg/ml.

6.1.3 Conjugación de anticuerpo policlonal anti-CNT2 con gelonina

30 Para obtener una relación molar 5:1 de gelonina a anticuerpo anti-CNT2, se necesitó hacer reaccionar 0,5mg de gelonina tiolada con 0,5mg de anticuerpo anti-CNT2. De acuerdo con esto, se añadieron 138µl de anticuerpo anti-CNT2 tratado con SPDP a 167µl de gelonina tiolada.

La reacción también se realizó a una relación molar 10:1 de gelonina a anticuerpo anti-CNT2 (se añadió 1mg de gelonina tiolada en 333µl a 0,5mg de anticuerpo anti-CNT2 tratado con SPDP en 138µl). Cada reacción se selló bajo nitrógeno y se incubó durante 20 horas a 4°C. Después de este tiempo, todos los restos sulfidrilos sin reaccionar se bloquearon por la adición de yodoacetamida a una concentración final de 2mM.

6.1.4 Análisis del conjugado

40 Cada mezcla de reacción se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, SDS-PAGE y ELISA. Los datos (no mostrados) obtenidos de la separación por SDS-PAGE de las mezclas de reacción y la espectrometría de masas revelaron que cada reacción de conjugación fue exitosa y se identificaron especies con 1, 2 y 3 moléculas de gelonina conjugadas con una única molécula de anticuerpo. Aunque los datos de espectrometría de masas revelaron la presencia de algo de anticuerpo no conjugado, la cantidad fue insuficiente para observarse en un gel de SDS-PAGE teñido con coomassie. Parece que no hay diferencia en la eficacia de la conjugación entre las 2 relaciones de la reacción.

45 Los ensayos ELISA se realizaron como se ha descrito anteriormente en cada mezcla de reacción con el fin de evaluar si la actividad de unión del anticuerpo estaba influida por la reacción de conjugación. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12 Datos de ELISA para la conjugación de gelonina con anticuerpos policlonales anti-CNT2

Muestra	Titulación del 50% de Unión
Anti-CNT2 policlona	0,051µg/ml
Anti-CNT2 policlona tratado con SPDP	0,134µg/ml
Relación molar 5:1 de gelonina tiolada: anticuerpo policlona anti-CNT2 tratado con SPDP	0,33µg/ml
Relación molar 10:1 de gelonina tiolada: anticuerpo policlona anti-CNT2 tratado con SPDP	0,22µg/ml

Puede observarse que la unión se vio influida tanto por la adición del policonector SPDP como por la conjugación con gelonina. Sin embargo, la mezcla de reacción del anticuerpo conjugado todavía presenta una unión significativa. Esto puede atribuirse tanto al anticuerpo conjugado como no conjugado en la mezcla de reacción. Como la cantidad de anticuerpo no conjugado es baja, se asume que una buena proporción de la unión observada puede atribuirse al anticuerpo conjugado.

6.2 Conjugación de gelonina recombinante con anticuerpos policlonales anti-CNT2 de rata

La misma estrategia indicada anteriormente en el Ejemplo 6.1 se adoptó con el fin de conjugar gelonina recombinante, producida como se ha descrito en el Ejemplo 5 anterior, con anticuerpos policlonales anti-CNT2 de rata. Se usó una relación molar 5:1 gelonina a anticuerpo policlona anti-CNT2 para obtener la mezcla de reacción más eficaz.

6.2.1 Tratamiento con SPDP del anticuerpo policlona anti-CNT2

Se mezclaron 3,75mg de policlona del conejo 1 purificado con proteína A como una disolución de 10mg/ml en PBS/10mM EDTA pH 8 con 11,25µl de SPDP (3mg/ml en DMF) y se incubó durante 30min a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se pasó a través de una columna de desalado Zeba (Pierce Chemical Co.) preequilibrada con PBS/10mM EDTA pH 8.

6.2.2 Tiolación de la gelonina recombinante

Se prepararon 3,75mg de gelonina recombinante hasta 10mg/ml en 50mM trietanolamina 10mM EDTA pH 8. Se disolvió 2-iminotiolano (reactivo de Traut; Sigma-Aldrich) hasta 20mg/ml en H₂O desionizada desgaseada y con burbujeo de nitrógeno, 26,25µl de esto se añadieron a la disolución de gelonina y se incubó en una atmósfera de nitrógeno en hielo durante una hora. La gelonina tiolada se pasó a través de una columna de desalado Zeba (Pierce Chemical Co.) preequilibrada con PBS/10mM EDTA pH 8.

6.2.3 Conjugación de anticuerpo policlona anti-CNT2 con gelonina recombinante

La disolución de anticuerpo que se había hecho reaccionar con SPDP se mezcló con la disolución de gelonina tiolada recombinante lo que resultó en cantidades iguales de cada constituyente de proteína, proporcionando una relación molar 5:1 de gelonina recombinante a anticuerpo. La reacción se selló bajo nitrógeno y se incubó durante 20 horas a 4°C.

Después de este tiempo, los grupos sulfidrido que no habían reaccionado se bloquearon por la adición de yodoacetamida hasta una concentración final de 2mM, seguido de un mínimo de una hora de incubación a temperatura ambiente.

6.2.4 Separación del conjugado de la gelonina recombinante no conjugada

Se usó filtración en gel con PBS para separar las moléculas de gelonina no conjugadas de los conjugados. Se equilibró una columna 10/300 Superdex 200 (Amersham-Pharmacia) en PBS con 3 volúmenes de columna (CV) usando una unidad FPLC Akta (Amersham-Pharmacia). La cromatografía se controló por un programa informático de PC Unicom (Amersham-Pharmacia), que inyectó la muestra y mantuvo una velocidad de caudal de 0,5ml/min, recogiendo fracciones de 0,5ml en un bloque de 96 pocillos después de que hubieran eluido 0,1 CV. Se dejó que la elución continuara durante 1,4 CV.

Las fracciones seleccionadas se analizaron en un gel de SDS-PAGE no reductor (4-12% bis-tris NuPage en tampón MOPS; Invitrogen) como describe el fabricante. El gel se tiñó usando la tinción de coomassie SimplyBlue (Invitrogen)

como describe el fabricante. Las fracciones que se determinó que contenían los conjugados se combinaron y se sometieron a la siguiente etapa de purificación.

6.2.5 Separación del Conjugado del anticuerpo anti-CNT2 no Conjugado

La presencia de una cola de hexa-histidina C terminal en las moléculas de gelonina recombinante permitió la aplicación de cromatografía de afinidad con quelante de metal inmovilizado (IMAC) como una segunda etapa cromatográfica en la purificación de los conjugados. La ausencia de un resto hexa-histidina en el anticuerpo no conjugado (todavía presente en las fracciones de conjugado después de la filtración en gel) permite la separación del anticuerpo libre de los conjugados que contienen hexa-histidina. Por lo tanto, las fracciones combinadas obtenidas en 6.2.4 anterior se pasaron a través de una columna de afinidad con níquel HisTrap HP de 1ml (pre-equilibrada con 5 CV de PBS/15mM imidazol; Amersham Biosciences) unida a una unidad de FPLC Akta controlada por un programa informático de PC Unicorn (Amersham Biosciences).

La carga y lavado de la columna se realizó sobre 5 CV usando PBS/15mM imidazol como el tampón de carga/lavado. La elución de las proteínas que contienen hexa-histidina se realizó por la aplicación de un gradiente de 15mM a 500mM imidazol (en PBS) sobre 20 CV. Las fracciones se recogieron en volúmenes de 0,5ml en un bloque de 96 pocillos.

Las fracciones seleccionadas se analizaron en un gel de SDS-PAGE no reductor (4-12% bis-tris NuPage en tampón MOPS; Invitrogen) como describe el fabricante. El gel se tiñó usando la tinción de coomassie SimplyBlue™ (Invitrogen) como describe el fabricante.

El gel reveló que los conjugados se habían purificado sustancialmente respecto al anticuerpo libre por la etapa de IMAC. Las fracciones que contienen los conjugados se combinaron y desalaron en PBS usando concentradores spin VivaSpin de 20ml con un punto de corte de peso molecular de 10kD.

6.2.6 Análisis del conjugado

Se usó espectrometría de masas MALDI-TOF para analizar la composición de la muestra de conjugado combinada respecto al anticuerpo anti-CNT2 no conjugado. Los espectros de masas obtenidos (no mostrados), indicaron la presencia de relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 de especies de conjugado anticuerpo:gelonina en la fracción de conjugado combinada (Grupo B). No se observaron especies independientes de anticuerpo no conjugado cargadas, sin embargo se identificó un pico en el espectro que se correlaciona con una especie doblemente cargada de anticuerpo no conjugado. Así, aunque la mayoría del anticuerpo no conjugado se eliminó por purificación del anticuerpo conjugado (según se indica por análisis de SDS-PAGE de la purificación con IMAC), puede deducirse que una cantidad muy pequeña de anticuerpo no conjugado permanece en la muestra purificada combinada.

La actividad funcional del conjugado en la muestra combinada purificada con IMAC se evaluó por ELISA (para determinar el efecto de la conjugación en la unión del anticuerpo) y por un ensayo de inhibición de traducción *in vitro* (para determinar si la actividad funcional de la gelonina había sido influida por la conjugación).

El ELISA (datos no mostrados) reveló resultados similares a los observados para la conjugación de gelonina suministrada comercialmente (Ejemplo 6.1.4 anterior): la unión del anticuerpo se vio influida tanto por la adición del policonector SPDP como por la conjugación con gelonina recombinante, pero la mezcla de reacción del anticuerpo conjugado todavía presentaba una unión significativa al RSPE de CNT2 de rata.

Aunque los análisis de espectrometría de masas indicaron que todavía puede permanecer algo de anticuerpo no conjugado incluso después de la purificación por IMAC, la cantidad de anticuerpo no conjugado en las muestras purificadas por IMAC será menor que en la mezcla de reacción de la conjugación para la gelonina natural/anticuerpo anti-CNT2 como consecuencia de la purificación por IMAC. De acuerdo con esto, la unión del anticuerpo observada puede atribuirse que se debe principalmente al conjugado anticuerpo anti-CNT2-gelonina recombinante.

La retención de la actividad de inhibición de ribosoma de la gelonina recombinante conjugada con el anticuerpo anti-CNT2 en la muestra combinada que contiene el conjugado de la purificación por IMAC se determinó usando el sistema rápido acoplado de transcripción/traducción TNT (Promega) como describe el fabricante. La Figura 2 muestra los resultados. La inhibición de la traducción que presentan los conjugados en la muestra combinada purificada por IMAC (Grupo B) es equivalente a la de la gelonina recombinante original (rGelonina). Así, se ha mantenido la capacidad de inhibición de ribosomas después de la conjugación.

6.3 Conjugación de β -purotionina disponible comercialmente con anticuerpos policlonales anti-CNT2 de rata

La estrategia elegida para esta conjugación fue usar el agente de entrecruzamiento TFCS (Pierce), que tiene un brazo espaciador largo, con el fin de proporcionar tanta exposición como sea posible a la molécula de β -purotionina que es relativamente pequeña (5kDa). TFCS tiene un grupo éster NHS en un extremo, que se une a los grupos

amino del anticuerpo y un grupo amino protegido en el otro extremo, que está expuesto para reaccionar con β -purotionina tratada apropiadamente elevando el pH a 8. Los grupos carboxilo de la purotionina se hacen reaccionar con EDC para formar un intermedio reactivo amino inestable que se hace reaccionar con sulfo-NHS para proporcionar una unión más estable. La β -purotionina tratada con EDC/sulfo-NHS se une al extremo amino del conector TFCS.

6.3.1 Tratamiento con TFCS de CNT2 policlonal

Se concentró una alícuota de 1ml de la IgG policlonal del conejo 1 purificada con Proteína A (véase el Ejemplo 4.2.1, el sangrado recogido del conejo 1 se purificó por afinidad y se purificó usando una columna de Proteína A) usando un concentrador centricon con un punto de corte de 10kDa. El volumen de muestra resultante se subió hasta 5mg/ml 0,1M tampón de Fosfato de Sodio 0,15M NaCl pH 7.2. Se añadieron 15 μ l de TFCS (3mg/ml en DMF) por 500 μ l de anticuerpo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de desalado PD10 equilibrada con 0,1M tampón fosfato pH 8.

Todo el volumen de 3,5ml de muestra se recogió y se concentró usando un concentrador centricon para obtener anticuerpo anti-CNT2 tratado con TFCS a una concentración final de 10mg/ml.

6.3.2 Tratamiento con EDC y sulfo-NHS de β -purotionina

Se disolvió β -purotionina liofilizada de endosperma de trigo (Takara) en 0,1M tampón de Fosfato de Sodio 0,15M NaCl pH 7,2 hasta una concentración final de 10mg/ml. Se añadió EDC para proporcionar una concentración final de 2mM junto con sulfo-NHS a una concentración final de 5mM, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se paró por la adición de 2-mercaptoetanol a una concentración final de 20mM. La β -purotionina activada se aplicó a una columna de desalado de poliacrilamida (límite de exclusión por tamaño de 1.800 Da; Pierce) equilibrada con 0,1M tampón de Fosfato de Sodio, 0,15M NaCl pH 7,2. Se recogieron fracciones y la DO280nm se determinó para la presencia de la toxina.

6.3.3 Conjugación de anticuerpo policlonal anti-CNT2 con β -purotionina activada

Se mezclaron el anticuerpo tratado con TFCS y la β -purotionina tratada con EDC/sulfo-NHS para proporcionar una relación molar 30:1 de β -purotionina:anticuerpo anti-CNT2 y se dejó reaccionar a 4°C toda la noche. La reacción se paró por la adición de hidroxilamina a una concentración final de 10mM. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de cromatografía de exclusión por tamaño para separar la β -purotionina libre del conjugado anticuerpo- β -purotionina. Las fracciones que contienen el conjugado se combinaron.

6.3.4 Análisis del conjugado

Se usó espectrometría de masas MALDI-TOF para analizar la composición de la muestra de conjugado combinada respecto al anticuerpo anti-CNT2 no conjugado. Los espectros de masas obtenidos (no mostrados) indicaron la presencia de relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 de especies de conjugado anticuerpo: β -purotionina en las fracciones de conjugado combinadas. También se observaron algunas especies de anticuerpo no conjugado marcadas.

La actividad funcional del conjugado en la muestra combinada se evaluó por ELISA como se ha descrito anteriormente. La titulación del 50% de unión para el conjugado se calculó a 0,067 μ g/ml en comparación con 0,041 μ g/ml para el anticuerpo anti-CNT2 no conjugado.

Tabla 13 Análisis inmunohistoquímico del tejido gastrointestinal de rata con conjugado anti-CNT2:: β -purotionina

Intervalo de dilución	Dilución del conjugado con tinción presente	Duodeno de Rata	Yeyuno de Rata	Íleo de Rata	Colon de Rata	Bloqueado con péptido de bloqueo
1:25 - 1:50	1:25 y 1:50	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	No ensayado	No ensayado	Tinción de la mucosa muscularis y tinción de las células	No ensayado

epiteliales	epiteliales
de la vellosidad	de la vellosidad
y de la	y de la
cripta	cripta

Se usó una muestra del conjugado anti-CNT2:: β -purotionina para el análisis inmunohistoquímico de tejido gastrointestinal de roedor (véase el Ejemplo 4.2 para la metodología). Los resultados se resumen en la Tabla 13 anterior.

EJEMPLO 7 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN

- 5 Los vectores de expresión de la proteína de fusión se construyeron entre un scFv que reconoce un antígeno de la superficie celular y tres toxinas proteicas diferentes, gelonina, granzima B, y cyt2A. Los scFv usados en este ejemplo son los scFv de SV63 descritos en el Ejemplo 2.5 anterior. A lo largo del proceso se siguieron técnicas de biología molecular estándar para la preparación de los plásmidos, digestión por enzimas de restricción, ligación, transformación de *E. coli* etc.

10 7.1 Construcciones de fusión gelonina-scFv

El gen que codifica la proteína gelonina de 251 aminoácidos (véase Nolan *et al. supra*) se sintetizó artificialmente con la secuencia 5' diseñada para permitir la fusión en marco a la secuencia que codifica V_H (lo que proporciona el gen artificial 054014) o V_L (lo que proporciona el gen artificial 054013) del anticuerpo SV63 y se subclonó en pCR-Script para proporcionar las dos construcciones p054013 y p054014.

- 15 El plásmido p054013 se digirió con *SpeI* y *NotI* y el fragmento que codifica la gelonina que se generó se purificó y se ligó a pDGF-SV63-VHVL digerido de manera similar, para proporcionar el vector pDGF-SV63-VHVLrGel.

Esto creó una fusión en marco entre el N terminal de scFv de SV63 a través de un único conector Gly₄Ser con la Gelonina recombinante. Así, el casete de expresión en pDGF-SV63-VHVLrGel comprende los componentes siguientes en la dirección 5' a 3': promotor *tac*, secuencia líder *pelB*, secuencia que codifica V_H de SV63, conector [Gly₄Ser]₃, secuencia que codifica V_L de SV63, conector Gly₄Ser, secuencia que codifica Gelonina recombinante.

20 La secuencia que codifica V_H de SV63, el conector [Gly₄Ser]₃, la secuencia que codifica V_L de SV63, el conector Gly₄Ser y la secuencia que codifica la Gelonina recombinante, pueden escindirse fácilmente como un fragmento *NcoI/EcoRI* y ligarse en vectores de expresión/clonación alternativos, por ejemplo en pIMS147 o pET32a, si se desea.

- 25 El plásmido p054014 se digirió con *BseRI* y *NotI* y el fragmento generado que codifica la gelonina se purificó y se ligó en pDGF-SV63-VLVH digerido de manera similar, para proporcionar el vector pDGF-SV63-VHVLrGel. Esto creó una fusión en marco entre el N terminal de scFv de a través de un único conector Gly₄Ser con la Gelonina recombinante. Así, el casete de expresión en pDGF-SV63-VHVLrGel comprende los componentes siguientes en la dirección 5' a 3': promotor *tac*, secuencia líder *pelB*, secuencia que codifica V_L de SV63, conector [Gly₄Ser]₃, secuencia que codifica V_H de SV63, conector Gly₄Ser, secuencia que codifica Gelonina recombinante.

30 La secuencia que codifica V_L de SV63, el conector [Gly₄Ser]₃, la secuencia que codifica V_H de SV63, el conector Gly₄Ser y la secuencia que codifica la Gelonina recombinante, pueden escindirse fácilmente como un fragmento *NcoI/EcoRI* y ligarse en vectores de expresión/clonación alternativos, por ejemplo en pIMS147 o pET32a, si se desea.

35 7.2 Construcciones de fusión Granzima B-scFv

Se prepararon dos construcciones, portando cada una Granzima B fusionada en N terminal con un scFv de SV63: pET32a::rGrzB::SV63 VHVL y pET32a::rGrzB::SV63 VLVH.

- 40 El plásmido pET32a::rGrzB::SV63 VHVL se construyó usando pET32a(+):rGrzB (Ejemplo 5.3 anterior) como un molde junto con un método de extensión por superposición de cebador para fusionar la secuencia que codifica la GranzimaB madura con el scFv de SV63 en la orientación VHVL (extremo N a C terminal) mediante un único conector Gly₄Ser.

(i) se añadió una secuencia 3' terminal que codifica un único conector Gly₄Ser a la secuencia que codifica la Granzima B madura usando pET32a(+):rGrzB como un molde para PCR con los cebadores pET F (SEQ ID NO: 54) y RoPro 071 G4S/rGrzB R1 (SEQ ID NO: 55).

(ii) se añadió una secuencia 5' terminal que codifica un único conector Gly₄Ser y parte de la secuencia que codifica la Granzima B a la secuencia que codifica VHL de SV63, usando pDGF-SV63-VHVL como un molde para PCR con los cebadores RoPro 074 K3rZB/G4S/VHVL F (SEQ ID NO: 56) y RoPro 075 pET/VHVL R (SEQ ID NO: 57).

5 Los productos de (i) y (ii) anteriores se purificaron y se mezclaron en cantidades equimolares antes de la extensión sin cebador y PCR posterior usando pET F (SEQ ID NO: 54) y RoPro 075 pET/VHVL R (SEQ ID NO: 57) para amplificar un producto de fusión de longitud completa que se clonó en pET32a(+) usando sitios únicos SfuI y NotI.

10 El plásmido pET32a::rGrzB::SV63 VLVH también se construyó usando pET32a(+):rGrzB (Ejemplo 5.3 anterior) como un molde junto con un método de extensión por superposición de cebador para fusionar la secuencia que codifica la GranzimaB madura con el scFv de SV63 en la orientación V_LV_H (extremo N a C terminal) mediante un único conector Gly₄Ser.

(i) se añadió una secuencia 3' terminal que codifica un único conector Gly₄Ser a la secuencia que codifica la Granzima B como se describe en (i) anterior.

15 (ii) se añadió una secuencia 5' terminal que codifica un único conector Gly₄Ser y parte de la secuencia que codifica la Granzima B a la secuencia que codifica VLVH de SV63, usando pDGF-SV63-VLVH como un molde para PCR con los cebadores RoPro 072 rGrzB/G4S/VLVH F (SEQ ID NO: 58) y RoPro 073 VLVH/pET R (SEQ ID NO: 59).

20 Los productos de (i) y (ii) anteriores se purificaron y se mezclaron en cantidades equimolares antes de la extensión sin cebador y la PCR posterior usando pET F (SEQ ID NO 54) y RoPro 073 VLVH/pET R (SEQ ID NO: 59) para amplificar un producto de fusión de longitud completa que se clonó posteriormente en pET32a(+) usando sitios únicos SfuI y NotI .

25 Las secuencias de los cebadores usados en la construcción de las construcciones de fusión Granzima B-scFv son como se han descrito en el Ejemplo 5.3 anterior y son como sigue (todos los cebadores se proporcionan 5' a 3'): pET F (SEQ ID NO: 54) TCGGTGATGTCGGCGATATAG; RoPro 071 G4S/rGrzB R1 (SEQ ID NO: 55) ACTACCTCCGCCACCGGACTTCTTCATA GTTTTCTTGATCCAGG; RoPro 074 rGrzB/G4S/VHVL F (SEQ ID NO: 56) GAAGAAGTCCGGTGGCGGAGGTAGTGAGGTCCAGCTGCAGGAGTCTGG CCCTGG; RoPro 075 pET/VHVL R (SEQ ID NO: 57) TGCTCGAGTGCGGCCG CTTATTACTTGATCTCCAGTTTGGTGCCTCCACCGAACG; RoPro 072 rGrzB/G4S/VLVH F (SEQ ID NO: 58) GAAGAAGTCCGGTGGCGGAGGTAG TGATATCGTTCTCACTCAATCTCCAGCAATC; RoPro 073 VLVH/pET R (SEQ ID NO: 59) TGCTCGAGTGCGGCCGCTTATTATGAGGAGACTGTGAGAGTGGTG CCTTGCC.

7.3 Construcciones de fusión Cyt2A-scFv

35 Con el fin de crear fusiones en marco de las secuencias SV63 scFv y Cyt2A se siguió el ejemplo de Gurkan y Ellar (2003 Protein Expr. Purif. 29(1): 103-16). El gen que codifica los primeros 237 aminoácidos de Cyt2Aa1 (EMBL:BTCYTBG) se sintetizó artificialmente para contener una secuencia 3' diseñada para crear una adición C terminal en marco del epítipo de 14 aminoácidos Xpress (Invitrogen). Esta secuencia del epítipo Cyt2A-Xpress sintetizada artificialmente se conoce como 051072 y se subclonó en pCR Script para proporcionar p051072. El plásmido pDGF-SV63-VHVL (véase el Ejemplo 2.5) se alteró en dos etapas. En primer lugar, se diseñó y se produjo una secuencia sintetizada artificialmente (denominada p054247) que crearía un fragmento conector al contener parte de la secuencia 3' terminal de la secuencia de VL de SV63, el conector (Gly₄Ser)₃ y parte de la secuencia 5' terminal de la proteína Cyt2Aa1 madura (como describen Gurkan y Ellar, *supra*). Este fragmento se escindió de p054247 usando *SpeI* (5') y *EcoRI* (3') y se ligó en pDGF-SV63-VHVL preparado de manera similar (véase el Ejemplo 2.5). El plásmido resultante se modificó adicionalmente cortando con *SfuI* y *BamHI* e introduciendo el fragmento de aproximadamente 520pb *SfuI/BamHI* (que representa el extremo 3' de la secuencia de Cyt2Aa1 madura más el epítipo Xpress) de p051072. El plásmido resultante (pDGF-SV63-VHVL::Cyt2A) comprende una fusión en marco completa de V_HV_L scFv de SV63 mediante un conector flexible con la forma activa (madura) de Cyt2Aa1 (aminoácidos 37 a 237) seguido del epítipo Xpress.

50 De manera similar, el plásmido pDGF-SV63-VLVH se modificó en un proceso de dos etapas para introducir la secuencia Cyt2Aa1. En primer lugar, se diseñó y se produjo una secuencia sintetizada artificialmente (denominada 054248) que crearía un fragmento conector al contener parte de la secuencia 3' terminal de VH de SV63, el conector (Gly₄Ser)₃ y parte de la secuencia 5' terminal de la proteína Cyt2Aa1 madura (como describen Gurkan y Ellar, *supra*). La secuencia artificial se subclonó en pCR Script para proporcionar el plásmido p05428. Este fragmento se escindió de p054248 usando *BseRI* (5') y *EcoRI* (3') y se ligó en pDGF-SV63-VLVH preparado de manera similar. El plásmido resultante se modificó adicionalmente cortando con *SfuI* y *BamHI* e introduciendo el fragmento de aproximadamente 520pb *SfuI/BamHI* (que representa el extremo 3' de la secuencia de Cyt2Aa1 madura más el epítipo Xpress) de p051072. El plásmido resultante (pDGF-SV63-VLVH::Cyt2A) comprende una fusión en marco completa de V_LV_H scFv de SV63 mediante un conector flexible con la forma activa (madura) de Cyt2Aa1 (aminoácidos 37 a 237) seguido del epítipo Xpress.

EJEMPLO 8 EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Los vectores que portan los genes de fusión SV63 scFv-gelonina (véase el Ejemplo 7.1 anterior) se transformaron en células TOP10 de *E. coli*. Los estudios de expresión piloto se realizaron creciendo las células transformadas en medio 2x YT/2% glucosa, antes de inducir a 20°C ó 15°C en medio 2 x YT suplementado con 1 mM IPTG durante 16 horas. Se recogieron pequeñas muestras (10ml) y se centrifugaron y cada sedimento celular se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (PBS). Las muestras se sonicaron, se volvieron a centrifugar a 13.000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y los sobrenadantes (fracciones solubles) se decantaron. Los sedimentos (fracciones insolubles) se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis.

Las fracciones solubles e insolubles se analizaron por transferencia Western usando un anticuerpo dirigido frente a la etiqueta de hexa-histidina. El análisis reveló que la proteína de fusión scFv-gelonina se había producido a partir de ambos vectores de expresión (es decir, cuando scFv estaba en la orientación VHVL y cuando scFv estaba en la orientación VLVH). Sin embargo, la orientación VLVH de scFv proporcionó un rendimiento mayor de la proteína soluble.

Se realizó un crecimiento e inducción a mayor escala y la proteína de fusión scFv-gelonina se purificó adicionalmente a partir de la fracción soluble mediante una purificación en una columna Gravitrap.

EJEMPLO 9 ENSAYO *IN VITRO* DE LOS CONJUGADOS DE PROTEÍNA Y LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La capacidad de los conjugados de proteína y las proteínas de fusión de la invención para causar daño en el tracto gastrointestinal superior se evalúa midiendo la permeabilidad de la mucosa al marcador no absorbible, manitol, usando secciones de duodeno aislado de rata. Los tejidos aislados *in vitro* se exponen a estos agentes de control de roedores, usando una modificación de un método publicado anteriormente (Heylings, 1991, Toxicol. Appl. Pharmacol. 107:482-493).

Brevemente, una sección de 10cm del tracto gastrointestinal (inmediatamente distal del estómago) de ratas macho adultas de la cepa Alderley Park (Ap:AK₁SD) se extrae inmediatamente después del sacrificio humanitario. El tejido se pone en medio TC199 oxigenado y todos los restos alimenticios se eliminan del intestino usando medio TC199 desde el extremo más alejado del estómago. Se preparan dos secciones de duodeno, cada una con una longitud de 2,5cm, la sección proximal (inmediatamente después del estómago) y la sección distal (inmediatamente después de la entrada del canal biliar).

Las secciones se unen de forma tensa cuidadosamente mediante ligaduras a los extremos abiertos de dos tubos de vidrio conectados a un reservorio. Esto permite que las superficies luminal (mucosal) y del lado sanguíneo (serosal) de la mucosa aislada puedan ser bañadas por disoluciones independientes. El hueco entre los extremos de las varillas de vidrio en cada cámara mucosal es 12mm. Una representación en diagrama del aparato es similar a la mostrada en la parte superior de la Figura 1 de Heylings 1991 *supra*. La cámara con la mucosa unida se lava con medio TC199 oxigenado varias veces para eliminar el moco en exceso del lado luminal del tejido. El lado luminal (mucosal) se llena con 4ml de medio TC199 que contiene 20mg manitol/ml (TC199-M), y se comprueba si la mucosa tiene fugas. La cámara mucosal se sumerge en un recipiente de vidrio externo con forma de copa relleno con 40ml de medio TC199 (disolución del lado serosal) que se gasea con 95% O₂:5% CO₂. La cámara se pone para evitar gradientes de presión hidrostática entre las dos disoluciones de lavado. Ambas disoluciones se mantienen a 37 ± 0,1°C mediante una cubierta de agua conectada a una bomba externa. Después de un periodo de preincubación de 10 minutos, la cámara mucosal se quita y se lava a través con medio TC199-M para eliminar el moco que se haya creado, finalmente el lado luminal se llena con 4ml de TC199-M que contiene ¹⁴C-Manitol (un no electrolito que se absorbe poco por el tracto gastrointestinal) a una concentración de 5 x 10⁵ dpm/ml y se vuelve a poner en la cámara de vidrio.

Con el fin de medir la permeabilidad de la mucosa duodenal aislada al manitol, se toman alícuotas en duplicado de 150µl de la disolución del lado serosal a 10, 20, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos, después de su adición al lado mucosal. La cantidad de manitol absorbida se determina por conteo de centelleo líquido. Como control positivo, se añade paraquat (40mg ión paraquat/ml), un irritante tóxico conocido del tracto gastrointestinal, a la cámara mucosal 30 minutos después de comenzar la incubación con el fin de demostrar que el modelo es capaz de detectar el daño mucosal. Los agentes de control de roedores (proteínas de fusión o conjugados de proteína, véanse por ejemplo los Ejemplos 6 a 8 anteriores) se añaden por adición directa de un volumen pequeño a la cámara mucosal 30 minutos después de comenzar la incubación y se monitoriza el perfil del curso del tiempo de la absorción de manitol. Esto se compara con controles negativos simultáneos tanto para los segmentos proximales como distales de duodeno de rata realizados paralelamente.

La metodología descrita anteriormente usa tejido duodenal, sin embargo, otras áreas del tracto gastrointestinal pueden sustituirse y ensayarse usando el mismo procedimiento que el descrito anteriormente.

EJEMPLO 10 ENSAYO IN VIVO DE CONJUGADOS DE PROTEÍNA Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN**10.1 Ensayo de la eficacia por sonda nasogástrica oral en el ratón**

5 Se dosificarán ratones (18 en total, 9 por grupo) oralmente por sonda nasogástrica con i) conjugado de proteína o proteína de fusión (véanse en particular los Ejemplos 6 a 8 anteriores; grupo 1 ratones), o ii) vehículo inerte (p. ej. polietilén glicol; grupo 2 ratones). Los animales se sacrificarán 24, 48 y 72 horas después de la dosificación, realizándose observaciones clínicas regularmente a lo largo del estudio. Después del sacrificio, se fijará el tejido del duodeno, yeyuno, íleo y colon en disolución salina tamponada formal, se procesará y se incluirá en cera y se teñirá con H&E para la evaluación patológica.

10 Las proteínas de fusión/conjugados de proteína se emplean a las concentraciones de ensayo siguientes (proporcionadas en mg de compuesto por kg de peso corporal): 8mg/kg, 5mg/kg y 3mg/kg.

<110> Syngenta Limited
 <120> CONTROL DE PLAGAS
 <130> 70624/PCT/WO
 <150> GB0505054.7
 5 <151> 2005-03-11
 <150> GB0600719.9
 <151> 2006-01-13
 <160> 59
 <170> Versión PatentIn 3.1
 10 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> RSPE del transportador de oligopéptido PepT1 de rata
 <400> 1
 Val Ile Arg Ser Arg Ala Ser Asp Gly Cys Leu Glu Val Lys Glu
 1 5 10 15
 <210> 2
 20 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE del transportador de oligopéptido PepT1 de rata
 25 <400> 2
 Cys Ser Ser Asp Phe Lys Ser Ser Asn Leu Asp
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de CD155 de rata
 <400> 3
 Ser Asn Val Asn Gly Ser Tyr Arg Glu Met Lys Glu Thr Gly Ser Gln
 1 5 10 15
 35

Pro

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de GTR2 de rata

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

<210> 5

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de transportador de cloro CFTR de rata

15 <400> 5

Leu Lys Asn Asn Pro Val Asn Gly Gly Asn Asn Gly Thr Lys Ile Ala
1 5 10 15

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de transportador de nucleósidos CNT2 de rata

<400> 6

Trp Gln Asp Lys Glu Ser Ser Leu Arg Asn Leu Ala Lys
1 5 10

25 <210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> RSPE de transportador de aminoácidos colónico CATB(0+) de rata

<400> 7

Gly Gly Asp Met Phe Met Asn Ile Ser Trp Val Asn
1 5 10

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de MDR1 de rata

<400> 8

Ser Phe Thr Pro Ser Arg Asp Pro His Ser Asp Arg Ala Ile Thr
1 5 10 15

10 <210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> RSPE de MDR1 de ratón

<400> 9

Ser Phe Thr Lys Ala Glu Ala Ser Ile Leu Pro Ser Ile Thr
1 5 10

<210> 10

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de sucrasa-isomaltasa de rata

<400> 10

Tyr Asn Ala Glu Ser Ile Thr Asn Glu Asn Ala Gly Leu Lys Ala Thr
1 5 10 15

25 Leu

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> RSPE de GLUT7 de ratón
 <400> 11
 Asn Thr Pro His Lys Val Leu Lys Ser Phe Tyr Asn
 1 5 10
 <210> 12
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de GLUT7 de ratón/GTR5 de rata
 10 <400> 12
 Tyr Tyr Asp Arg Asn Lys Glu Asn Ile Glu Ser
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de Npt2a de rata
 <400> 13
 Pro Glu Thr Lys Glu Ala Ser Thr Ser Met Ser Arg Val Glu Ala
 1 5 10 15
 20 <210> 14
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> RSPE de OATP-B de rata
 <400> 14
 Leu Gly Ala Gln Pro Gly Pro Ser Leu Phe Pro Gly Cys Ser Glu Pro
 1 5 10 15
 Cys Ser Cys Gln Ser Asp Asp
 20
 <210> 15
 <211> 17

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de OATP-E de rata
 5 <400> 16
 Gln Pro Gly Pro Ser Leu Phe Pro Gly Cys Ser Glu Pro Cys Ser Cys
 1 5 10 15
 Gln
 <210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de ASBT de rata
 <400> 16
 Asp Ala Glu Phe Leu Glu Lys Thr Asp Asn Asp Met Asp
 1 5 10
 15 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> RSPE de CaTI de rata
 <400> 17
 Gln Ala Phe Gln Gln Gln Asp Asp Leu Tyr Ser Glu
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 15
 25 <213> Secuencia artificial<220>
 <223> RSPE de OATP3 de rata
 <400> 18
 Ser Tyr Lys Gly Val Gln His Gln Leu His Val Glu Ser Lys Val Leu
 1 5 10 15
 <210> 19

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> RSPE de ABCG3 de rata
 <400> 19

 Gln Ile Gln Phe Asn Gly His Ile Tyr Thr Thr Gln Ile Gly
 1 5 10

 <210> 20
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de GTR3 de rata
 <400> 20

 His Val Gly Leu Leu Val Pro Ile Ser Ala Glu Pro Ala Asp Val His
 1 5 10 15

 15 Leu Gly
 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> RSPE de MRP1 de rata
 <400> 21

 Met Phe Ala Gly Pro Glu Ile Leu Glu Leu Ile Ile Asn Phe
 1 5 10

 <210> 22
 25 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> RSPE de CNT1 de rata
 30 <400> 22

His Ser His Ser Ser Leu Pro Glu Gly Glu Gly Gly Leu Asn Lys Ala
1 5 10 15

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de UT-B de rata

<400> 23

Pro Ser Lys Leu Phe Met Pro Val Ser Ser Val Pro
1 5 10

10 <210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> RSPE de DRA1 de rata

<400> 24

Leu Ser Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Ser Met Ile Glu Glu Lys Val
1 5 10 15

Met Val

<210> 25

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de ENT1 de ratón

<400> 25

Lys Ala Arg His Cys Gly Ala Gln Arg His His Phe Val Phe Lys His
1 5 10 15

25 <210> 25

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> RSPE de ENT1 de rata

<400> 26

Thr Asn Gln Ser Cys Glu Ser Thr Glu Ala Leu Ala Asp Pro Ser Val
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 27

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPB de GCC de rata

10 <400> 27

Val Ser Gly Arg Phe Pro Ser Glu Arg Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de PLB de rata

<400> 28

Ala Glu Asp Leu Trp Ile Gln Ala Lys Glu Leu Val Arg His Leu Lys
1 5 10 15

20 Asp Asn Pro

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> RSPE de LPH de rata

<400> 29

Glu Asp Ala Ala Pro Thr Ala Ser Pro Val Gln Ser
1 5 10

<210> 30

30 <211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de LPH de ratón

<400> 30

Arg Tyr Val Gln Val Cys Ala Leu Cys Arg Phe Ser Thr Val Phe Ser
1 5 10 15

Pro Arg Leu Pro Glu Pro Val Lys Gly Glu Arg Arg Phe Ser His Ile
20 25 30

Ser Leu Asn Gln Asp Leu Pro Arg Pro Leu Phe Pro
35 40

5

<210> 31

<211> 13

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> RSPE de AfIPM de rata

<400> 31

Gly Ser Thr Ser Ala Thr Thr Ser Thr Thr Asn Pro Ala
1 5 10

<210> 32

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de MCDL de rata

<400> 32

Asn Lys Asp Ile Leu Leu Thr Thr Val Pro Met Glu Thr Glu Arg Thr
1 5 10 15

20 Ile Arg

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> RSPE de SCAB de rata

<400> 33

Leu Pro Gin Asp Leu Val Gly Met Gly Tyr Ala Pro Asp Arg He

1 5 10 15

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de SCAB de rata

<400> 34

Ser Ser Asn Pro Ala Pro Gly Ser Thr
1 5

10 <210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> RSPE de KCV2 de rata

<400> 35

Asp Gln Arg His Gly Lys Gly Ser Pro Arg Glu His Asp Leu Glu
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> RSPE de transportador de aminoácidos colónico CATS(0+) de rata

<400> 36

Asp Thr Gly Gly Asp Met Phe Met Asn Ile Ser Trp Val Asn Ser
1 5 10 15

25 <210> 37

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador RoPro-S

<400> 37

aggtsacgct gcagsagtcw gg

22

<210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador RoPro-22
 <400> 33
 ccaggggcca gtggatagac agatgggggt gtcgttt
 38
 10 <210> 39
 <211> 36
 <212> DKA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador RoPro-6
 <400> 39
 gaggtgaagc tgcaggagtc aggacctagc ctggtg
 36
 <210> 40
 20 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador RoPro-25
 25 <400> 40
 tgaggagacg gtgaccgtgg tccttgccc cc
 32
 <210> 41
 <211> 32
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador EoPro-3
 <400> 41
 35 ggtgatatcg tkctcacyca rtctccagca at
 32

.<210> 42
 <211> 32
 <212> ADN
 <2'13> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador RoPro-4
 <40Q> 42
 gggaagatgg atccagtgg tgcagcatca gc 32
 <210> 43
 10 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador scFv oligo 1
 15 <400> 43
 agcccgccat ggccgatatc gttctcactc aatc
 34
 <210> 44
 <211> 57
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador scFv oligo 2
 <400> 44
 25 cgccagagcc accgccaccg ctaccgccac cgcccttgat ctccagfcttg gtcctc
 57
 <210> 45
 <211> 56
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador scFv- oligo 3
 <400> 45
 agcgggtggcg gtggctctgg cggtggcggg agcgagggtcc agctgcagga gfcttg
 35 56
 <210> 46

<211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador scPv oligo 4
 <400> 46
 ctatgaattc agtgggtggtg gtgggtggtgc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtctgaggag
 60
 actgtgagag tgggtgc
 10 76
 <210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador scFv oligo 5
 <400> 47
 agcccgccat ggccgaggtc cagctgcagg agtctg
 36
 20 <210> 48
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <223> Cebador scFv oligo 6
 25 <400> 48
 cgccagaacc acctccgccg ctccgccac cgcctgagga gactgtgaga gtggtgcc
 58
 <210> 43
 <211> 55
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador scFv oligo 7
 <400> 49
 35 agcggcggag gtggttctgg cgggtggcga agcgatatcg ttctactca atctc
 55

<210> 50
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador scFv oligo 8
 <400> 50
 gtatgaattc agtgggtggfcg gtgggtgggc ttgtcgtcgt cgtccttgfca gcccttgatc
 60
 10 tccagtttgg tgcctc
 76
 <210> 51
 <211> 49
 <223> Cebador RoPro07Q pefcSK/rGraB FI
 15 <400> 51
 ggta'ccgacg acgacgacaa gatcatcggt ggtcacgaag ctaagccac
 49
 <210> 52
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador RoPro067 rGrzS R
 <400> 52
 25 agctggcggc cgctaggac 20
 <210> 53
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador RoPro076 petEK/rGrsB F2
 <400> 53
 agatctgggt accgacgacg acgac
 25
 35 <210> 54
 <211> 21

<223> Cebador pET F
 <400> 54
 tcggtgatgt cggcgatata, g
 21

5 <210> 55
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> Cebador RoPro 071 G4S/rGrzB RI
 <400> 55
 actacctccg ccaccggact. tctcatagt fcttctgac cagg
 44
 <210> 56

15 <211> 54
 <212> D3KA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

20 <223> Cebador RoPro 074 rGrzB/G4S/VHVL F
 <400> 56
 gaagaagtcc ggtggcggag gtagtgaggt ccagctgcag gagtcfcgcc ctgg
 54
 <210> S7
 <211> 55

25 <223> Cebador RoPro 075 pET/VHVL R
 <400> 57
 tgctcgagt cggccgctta ttactgac tccagttcgg tgctccacc gaacg 55
 <210> 5S
 <211> 55

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cebador RoPro 072 rGrzB/G4S/VLVH F
 <400> 58

35 gaagaagtcc ggtggcggag gtagtgatat cgttctcact caatctccag caatc
 55

<210> 59

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador RoPro 073 VLVH/pET R

<400> 59

tgctcgagtg cggccgctta ttatgaggag actgtgagag tggcgccttg gcc

53

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente de control rodenticida que comprende un componente de anticuerpo que se une a un epítipo peptídico específico de roedores (RSPE), en el que dicho RSPE consiste en un fragmento oligopeptídico de una proteína expresada en un roedor, en el que la secuencia del fragmento oligopeptídico representa un epítipo peptídico continuo extracelular que tiene un porcentaje de identidad de 60% o menos con una secuencia peptídica lineal correspondiente de una proteína homóloga de un animal no diana en el que el componente de anticuerpo está unido a un componente tóxico.
- 10 2. Un agente de control de roedores según la reivindicación 1 que comprende una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión un primer componente de proteína y un segundo componente de proteína, siendo dicho primer componente de proteína el componente de anticuerpo y siendo dicho segundo componente de proteína una toxina.
3. Un agente de control de roedores según la reivindicación 2, en el que dicho primer y segundo componentes de proteína están unidos entre sí mediante un conector peptídico.
- 15 4. Un agente de control de roedores según la reivindicación 3 en el que dicho conector peptídico comprende restos de Glicina y Serina, comprendiendo el conector al menos tres restos (Gly₄Ser) .
5. Un agente de control de roedores según la reivindicación 1 que comprende un conjugado de proteína, comprendiendo dicho conjugado de proteína un componente de anticuerpo según la reivindicación 1 conjugado químicamente con un componente tóxico.
- 20 6. Un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el componente tóxico es una toxina proteica.
7. Un agente de control de roedores según la reivindicación 6, en el que dicha toxina es a) una proteína de longitud completa seleccionada del grupo de proteínas listadas en el grupo 1, en el que el grupo 1 consiste en una proteína que desorganiza las membranas, una ribosiltransferasa, una serina proteasa, un activador de guanilil ciclasa, una proteína implicada en el transporte de iones mediado por ATPasa, una adenilil ciclasa dependiente de calmodulina y una ribonucleasa, o es b) un dominio tóxico de una proteína seleccionada del grupo 1.
- 25 8. Un agente de control de roedores según la reivindicación 6, en el que dicha toxina es a) una glicosidasa de ARN de longitud completa o es b) un dominio tóxico de una glicosidasa de ARN.
- 30 9. Un agente de control de roedores según la reivindicación 7, en el que dicha toxina es a) β-purotionina de longitud completa o una proteína de longitud completa seleccionada del grupo de proteínas listadas en el grupo 2, en el que el grupo 2 consiste en Perfringolisina O, Hemolisina alfa, Esfingomelinasa, Hemolisina delta, Granzima B, Toxina alfa, Toxina Cyt, Toxina de la difteria, Granulisina, Melitina, Perforina, Enterotoxina del cólera, Enterotoxina estable con calor, Equinatoxina, Listeriolisina, VIP2, Enterotoxina auxiliar, Aerolisina, BinA, BinB, Colicina E1, Hemolisina A, CTX IV, Ricina, Amebaporo, Hemolisina El Tor, Hemolisina de *Virbio damsela*, Pneumolisina, Estreptolisina O, Toxina de Kanagawa, Hemolisina de *Leptospira*, Toxina Cry, Toxina del ántrax, Exotoxina A de *Pseudomonas*, Barnasa, y VIP3, o es b) un dominio tóxico de β-purotionina o un dominio tóxico de una proteína seleccionada del grupo 2.
- 35 10. Un agente de control de roedores según la reivindicación 8, en el que la toxina es gelonina.
- 40 11. Un agente de control de roedores según la reivindicación 5, en el que el componente tóxico es un compuesto tóxico seleccionado del grupo que consiste en: colchicina; doxorubicina; caliqueamicina; un compuesto fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID); citocalasina; un anticoagulante; calciferol; brometalina; flupropadina; fosfuro de cinc; escilirósido; (mono)fluoroacetato de sodio; fluoroacetamida; alfacloralosa; sulfato de talio, en el que el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en: brodificum, difenacum, bromadiolona, flocumafen, difetialona, hidroxycumarinas, e indano-dionas.
- 45 12. Un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína que se expresa en un roedor se expresa en el epitelio gastrointestinal.
- 50 13. Un agente de control de roedores según la reivindicación 12, en el que la proteína que se expresa en el epitelio gastrointestinal se selecciona del grupo que consiste en PEPT1 de rata, CD155 de rata, GTR2 de rata, CFTR de rata, CNT2 de rata, CATB(0+) de rata, MDR1 de rata, MDR1 de ratón, Sucrasa-Isomaltasa de rata, GLUT7 de ratón, GTR5 de rata, Npt2A de rata, OAT-B de rata, ASBT de rata, CAT1 de rata, OATP3 de rata, ABCG8 de rata, GTR8 de rata, MRP1 de rata, CNT1 de rata, UT-B de rata, DRA1 de rata, ENT1 de ratón y ENT1 de rata GCC de rata, PLB de rata, LPH de rata, LPH de ratón, AMPN de rata, MCDL de rata, SCAB de rata, KCV2 de rata.

14. Un agente de control de roedores según la reivindicación 13, en el que el RSPE se proporciona por una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-36.
15. Un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de éste.
- 5 16. Un agente de control de roedores según la reivindicación 15, en el que el anticuerpo es a) una inmunoglobulina que comprende cadenas ligeras y pesadas o b) un anticuerpo de cadena única.
17. Un agente de control de roedores según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo de cadena única es un scFv.
- 10 18. Un agente de control de roedores según la reivindicación 17, en el que el anticuerpo de cadena única carece de cadenas ligeras.
19. Un agente de control de roedores según la reivindicación 18, en el que el anticuerpo de cadena única se obtiene de Camélidos o de Chondrichthyes.
- 15 20. Un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una cadena ligera de inmunoglobulina, una cadena pesada de inmunoglobulina, un dominio VH, un dominio VL, Fv, Fab, di-Fab, Fab', F(ab')₂, un dominio VHH, un dominio IgNAR V y una CDR.
- 20 21. Un agente de control de roedores según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de anticuerpo presenta una unión desplazable al RSPE, pero no presenta una unión desplazable a: i) una proteína homóloga de un animal no diana, o; ii) un epítipo correspondiente de la proteína homóloga de un animal no diana.
22. Un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la forma de una composición que comprende además al menos un aditivo.
- 25 23. Un agente de control de roedores según la reivindicación 22, en el que el al menos un aditivo es un agente de control de roedores seleccionado del grupo que consiste en: un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, un anticoagulante de primera generación y un anticoagulante de segunda generación y/o al menos un aditivo tiene la función de hacer que la composición tenga un sabor agradable para los roedores.
- 30 24. Un método para matar un roedor que comprende poner un agente de control de roedores según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un área frecuentada por un roedor, de manera que después de la ingestión por dicho roedor de dicho agente de control de roedores, dicho roedor muera.

FIGURA 1

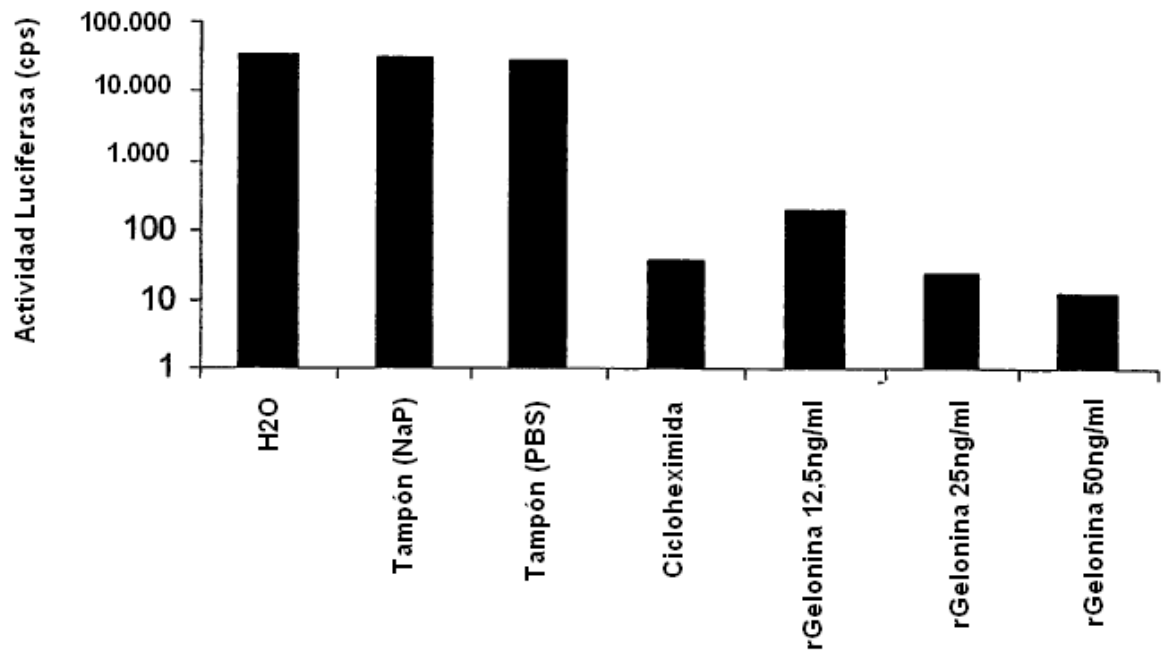


FIGURA 2

