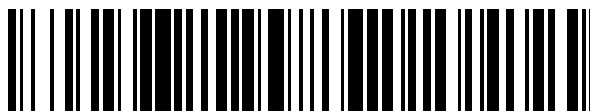


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 039**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08168439 .1**

96 Fecha de presentación: **05.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **2028193**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Dominios de inmunoglobulinas sintéticas con propiedades de unión modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones que determinan la complementariedad**

30 Prioridad:
05.01.2005 US 641144 P

45 Fecha de publicación de la mención BOP: **28.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente: **28.06.2012**

73 Titular/es:
**F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS-
UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H.
GASTGEBGASSE 5-13
1230 WIEN, AT**

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

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 384 039 T3

DESCRIPCIÓN

Dominios de inmunoglobulinas sintéticas con propiedades de unión modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones que determinan la complementariedad

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dominio variable de inmunoglobulina modificado.

El campo general corresponde a la modificación de proteínas con el objetivo de impartirlas unas propiedades de unión específica. De modo más concreto, las proteínas modificadas pertinentes en la presente son inmunoglobulinas (anticuerpos), y aún más concretamente, dominios individuales o parejas o combinaciones de dominios individuales de inmunoglobulinas. Las propiedades de unión específica de las inmunoglobulinas son características importantes, puesto que controlan la interacción con otras moléculas, tales como antígenos, y hacen que las inmunoglobulinas sean útiles para aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas.

La estructura básica de los anticuerpos se explicará en la presente utilizando como ejemplo una inmunoglobulina IgG1 intacta.

15 Dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas se combinan para formar la molécula en forma de Y del anticuerpo. Las cadenas pesadas tienen cada una cuatro dominios. Los dominios variables amino-terminales (VH) se encuentran en los extremos de la Y. Tras ellos se encuentran tres dominios constantes: CH1, CH2, y el carboxi-terminal CH3, en la base del tronco de la Y. Un tramo corto, el interruptor, conecta las regiones variable y constante de la cadena pesada. La bisagra conecta CH2 y CH3 (el fragmento Fc) al resto del anticuerpo (los fragmentos Fab). Puede producirse un fragmento Fc y dos fragmentos Fab idénticos mediante la ruptura proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacta. Las cadenas ligeras están construidas por dos dominios, uno variable (VL) y otro constante (CL), separados por un interruptor.

20 Las dos cadenas pesadas están conectadas por enlaces disulfuro en la región bisagra. Las cadenas ligeras están acopladas a las cadenas pesadas mediante otros enlaces disulfuro. En los dominios constantes, en diferentes posiciones, aparecen restos carbohidatos enlazados a través de Asn, dependiendo de la clase de inmunoglobulina. Para IgG1, dos enlaces disulfuro en la región bisagra, entre las parejas Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras están acopladas a las cadenas pesadas mediante dos enlaces disulfuro adicionales, entre Cys229s en los dominios CH1 y Cys214s en los dominios CL. Aparecen restos carbohidatos unidos a Asn306 de cada CH2, generando una protuberancia prominente en el tronco de la Y.

25 Estas características tienen profundas consecuencias funcionales. Las regiones variables de ambas cadenas pesada (VH) y ligera (VL) se encuentran en los "extremos" de la Y, en donde están colocadas para que reaccionen con el antígeno. Este extremo de la molécula es el lado en el que está localizado el N-terminal de la secuencia de aminoácidos. El tronco de la Y sobresale de tal modo que media de forma eficaz en las funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la interacción con los receptores de Fc, o ADCC y ADCP. Sus dominios CH2 y CH3 sobresalen para facilitar la interacción con proteínas efectoras. El C-terminal de la secuencia de aminoácidos se localiza en el lado opuesto del extremo, que puede denominarse "parte baja" de la Y. La estructura de una IgG1 intacta se ilustra en la figura 1a.

En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda (λ) y kappa (κ). Una inmunoglobulina concreta tiene cadenas κ o cadenas λ , nunca una de cada. No se han descubierto diferencias funcionales entre los anticuerpos que tienen cadenas ligeras λ o κ .

40 La organización estructural de los monómeros de la principal clase de inmunoglobulinas humanas se muestra en la figura 1b. Las clases se diferencian en la composición y en la secuencia de sus respectivas cadenas pesadas. Ambas IgM e IgE carecen de una región bisagra pero cada una contiene un dominio de cadena pesada adicional (CH4). El número y las localizaciones de los enlaces disulfuro (líneas) que conectan las cadenas se diferencian entre los isotipos. También se diferencian en la distribución de los grupos carbohidatos N-conectados, que se muestran simbólicamente como círculos.

45 Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos láminas beta muy compactadas entre sí en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina plegamiento de la inmunoglobulina. El plegamiento de la inmunoglobulina de dominios constantes contiene una lámina tricatenaria compactada junto a una lámina tetracatenaria. El plegamiento es estabilizado por enlaces de hidrógeno entre las cadenas beta de cada lámina, por enlaces hidrófobos entre restos de láminas opuestas en el interior, y por un puente disulfuro entre las láminas. La lámina tricatenaria comprende las cadenas C, F y G, y la lámina tetracatenaria tiene las cadenas A, B, E y D. Las letras A a G indican las posiciones secuenciales de las cadenas beta a lo largo de la secuencia de aminoácidos del plegamiento de la inmunoglobulina.

El plegamiento de dominios variables tiene 9 cadenas beta dispuestas en dos láminas de 4 y 5 cadenas. La lámina pentacatenaria es estructuralmente homóloga a la lámina tricatenaria de los dominios constantes, pero contiene dos cadenas más, C' y C''. El resto de las cadenas (A, B, C, D, E, F, G) tienen la misma topología y una estructura similar a sus homólogos en los plegamientos de inmunoglobulinas de dominios constantes. Un enlace disulfuro conecta las cadenas B y F en láminas opuestas, al igual que en los dominios constantes. El plegamiento de la inmunoglobulina se ilustra en la figura 2 para un dominio constante y un dominio variable de una inmunoglobulina.

Los dominios variables de ambas cadenas de inmunoglobulina ligera y pesada contienen tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son bucles que conectan las cadenas beta B-C, C'-C'', y F-G del plegamiento de la inmunoglobulina. Los restos en las CDR varían de una molécula de inmunoglobulina a otra, impartiendo especificidad de antígeno a cada anticuerpo.

Los dominios VL y VH en los extremos de las moléculas de anticuerpos están muy compactados entre sí de modo que las 6 CDR (3 en cada dominio) cooperan para construir una superficie (o cavidad) para la unión específica del antígeno. Por tanto, el sitio de unión al antígeno natural de un anticuerpo está compuesto por los bucles que conectan las cadenas B-C, C'-C'', y F-G del dominio variable de cadena ligera, y las cadenas B-C, C'-C'', y F-G del dominio variable de cadena pesada.

Utilizando la estructura tridimensional de una proteína como ayuda para el diseño, se han aleatorizado restos aminoácidos localizados sobre la superficie de muchas proteínas utilizando la estructura central de la proteína como andamiaje. Los ejemplos de esta estrategia se describen o se reseñan en las siguientes referencias que se incorporan en la presente como referencia: Nygren, P.A., Uhlen, M., Curr. Opin. Struct. Biol. (1997), 7:463-469; Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G., Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. (2004), 22:575-582; Vogt, M., Skerra, A., Chembiochem. (2004), 5:191-199; documento US 6.562.617.

El principio básico de esta técnica se basa en la observación de que muchas proteínas tienen un núcleo central estable, formado por disposiciones específicas de elementos de la estructura secundaria, tales como láminas beta o alfa-hélices, que están interconectados por estructuras, tales como bucles, vueltas, o espirales aleatorias. Generalmente, estos últimos tres elementos de estructura son menos cruciales para la estructura global de la proteína, y a menudo pueden intercambiarse restos aminoácidos en estos elementos de estructura sin destruir el plegamiento general de la proteína. Un ejemplo natural de este principio de diseño son las CDR de los anticuerpos. Los ejemplos artificiales incluyen lipocalinas, anquirinas y otros andamiajes de proteínas.

Los bucles que no son bucles de CDR en una inmunoglobulina nativa no tienen especificidad de unión al antígeno o de unión al epitopo pero contribuyen al plegamiento correcto de la molécula de inmunoglobulina completa y/o a sus funciones efectoras o a otras funciones y, por tanto, se denominan bucles estructurales para el objetivo de esta invención.

En la patente de EEUU 6.297.654 se demuestra que pueden prepararse anticuerpos alterados en los que un antígeno peptídico puede incorporarse a un bucle que no sea un bucle de CDR en un anticuerpo (Ab) en la región CH1 entre la región bisagra y la región variable, y el Ab resultante puede ser captado por una APC ("antigen presenting cells", células presentadoras de antígenos) de modo que el antígeno peptídico se presente sobre la superficie de la APC en el contexto de MHC II, y producir con ello una respuesta inmunológica. Estos péptidos insertados son epitopos y la estructura global de la molécula portadora no es importante. Se ha demostrado que puede colocarse un péptido ras sobre un bucle (que no sea un bucle de CDR) de una inmunoglobulina, y que la inmunoglobulina sigue siendo segregada. Existe un "control de calidad" estricto en las células que evita que la inmunoglobulina se segregue a menos que esté plegada correctamente, y la alteración de la secuencia de aminoácidos del bucle puede provocar que la proteína se pliegue en una estructura que la célula detecta como incorrecta, y por tanto la degrada. Así, además de los ejemplos mostrados, se consideró difícil modificar aún más los bucles estructurales sin cambiar la naturaleza de la inmunoglobulina.

La solicitud de patente de EEUU 2004/0101905 describe moléculas de unión que comprenden un sitio de unión a la diana y un péptido efector Fc. El péptido efector Fc es un péptido que interacciona con una molécula efectora. Se ha demostrado la inserción de un péptido efector en un bucle que no es un bucle de CDR de un dominio CH1 de un fragmento de inmunoglobulina.

Los péptidos efectores Fc son estructuras que aparecen en la naturaleza en los bucles que no son un bucle de CDR de los anticuerpos y, por tanto, se espera que no alteren la estructura de la inmunoglobulina si se injertan sobre diferentes localizaciones equivalentes en una inmunoglobulina.

No obstante, cada péptido injertado en un bucle que no es un bucle de CDR según esta descripción tiene una alta probabilidad de ser inactivo por el diferente entorno estructural del que se ha seleccionado.

En ambos documentos de la técnica anterior mencionados arriba, se indica que es difícil insertar péptidos en el

bucle que mantengan su estructura y función, puesto que resulta fundamental no alterar la estructura de plegamiento de la inmunoglobulina puesto que esta es importante para la función y la secreción.

El documento WO 01/83525 A2 describe la fusión de dominios Fc con péptidos biológicamente activos para aumentar la semivida *in vivo* de los péptidos. Los dominios Fc están conectados a los péptidos biológicos a través del N-terminal o C-terminal, o a través de una cadena lateral de aminoácido.

Las solicitudes de patente de EEUU 2004/01032101 y 2005/0244403 describen inmunoglobulinas mutantes con una afinidad de unión alterada por un ligando efector, que son los ligandos naturales para los bucles estructurales de los anticuerpos. En este documento, se describe una serie de mutaciones en diversas regiones a lo largo de la molécula entera de inmunoglobulina que influyen en la función efectora del anticuerpo completo.

Otros documentos de la técnica anterior demuestran que los andamiajes de tipo inmunoglobulina se han empleado hasta la fecha con el fin de manipular el sitio de unión al antígeno existente, introduciendo con ello nuevas propiedades de unión. Sin embargo, hasta la fecha sólo se han modificado regiones CDR para la unión al antígeno; en otras palabras, en el caso del plegamiento de las inmunoglobulinas, sólo se ha modificado el sitio de unión al antígeno natural para cambiar su afinidad o especificidad de unión. Existe una ingente cantidad de bibliografía que describe diferentes formatos de dichas inmunoglobulinas manipuladas, que se expresan con frecuencia en forma de fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab, mostrados sobre la superficie de partículas de fagos o expresados de forma soluble en diversos sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Entre los principales autores del campo están Greg Winter, Andreas Plückthun, y Hennie Hoogenboom.

Un objeto de la presente invención es proporcionar inmunoglobulinas con nuevos sitios de unión al antígeno introducidos, y métodos para modificar y preparar dichas inmunoglobulinas.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para modificar una inmunoglobulina que comprende al menos una modificación en una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión de dicha inmunoglobulina a un epitopo de un antígeno, en el que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epitopo, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucle estructural,
- modificar al menos un resto nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucles estructurales,
- trasladar dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- expresar dicha inmunoglobulina modificada,
- poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con un epitopo, y
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une a un dominio variable de inmunoglobulina, o a parte de éste, que comprende al menos una región de bucle estructural de un dominio variable de la cadena pesada o ligera de la inmunoglobulina, comprendiendo dicha al menos una región de bucle estructural al menos una modificación para proporcionar un sitio de unión que no es una CDR que se une a un epitopo de un antígeno, no uniéndose dicha región de bucle estructural no modificada a dicho epitopo, en el que dicha modificación comprende una mutagénesis en un bucle inferior seleccionado del grupo que consiste en los bucles que conectan las cadenas beta A-B, C-C', C''-D y E-F del dominio variable.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina modificada, en la que dicha región de bucle modificada está en cualquiera de Vh o Vl.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina modificada, en la que dicha región de bucle modificada está en la región C-terminal.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina modificada, que comprende un dominio bivalente o biespecífico.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina modificada, que comprende un único dominio de inmunoglobulina o un Fv monocatenario.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina modificada, con al menos dos regiones de bucles estructurales modificadas.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según la invención, en la que dicha región de bucle estructural modificada comprende al menos 6 modificaciones de

aminoácidos.

La invención se refiere también a una molécula que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según la invención, y al menos otra molécula de unión, en la que dicha otra molécula de unión se selecciona del grupo de inmunoglobulinas, receptores solubles, ligandos, ácidos nucleicos, y carbohidratos.

5 La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que se caracteriza porque dicha modificación está dentro de un dominio variable humano en una de las posiciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 89 a 101, en la que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT.

10 La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que se caracteriza porque dicha modificación está dentro de un dominio variable murino en una de las posiciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 92 a 101, en la que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT.

15 La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que tiene especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alergenitos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que tiene especificidad de unión a FcRn.

La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que tiene especificidad de unión a una molécula efectora.

20 La invención se refiere también a una inmunoglobulina, que comprende una inmunoglobulina humana, humanizada, quimérica, murina o de camello, o sus homólogos.

La invención se refiere también a un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina según la invención.

La invención se refiere también a una preparación farmacéutica que contiene una inmunoglobulina según la invención.

25 En particular, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina que se une específicamente a un epítopo de un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alergenitos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios. Mediante la modificación en la región de bucle estructural, la inmunoglobulina puede modificarse para unirse al epítopo. En una realización preferida, la inmunoglobulina se une específicamente al menos a dos de estos epítopos, que son diferentes entre sí, del mismo antígeno o de antígenos diferentes.

30 Por ejemplo, la invención se refiere a la modificación de una inmunoglobulina que se une específicamente al menos a un primer epítopo y que comprende al menos una modificación en al menos una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucle con al menos un segundo epítopo, seleccionándose dicho epítopo del grupo de antígenos mencionados anteriormente, en la que la región de bucle estructural no modificada (región que no es una CDR) no se une específicamente con dicho al menos un segundo epítopo, que comprende las etapas de:

- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente con al menos un primer epítopo que comprende al menos una región de bucle estructural,
- modificar al menos un resto nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucles codificadas por dicho ácido nucleico,
- trasladar dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
- expresar dicha inmunoglobulina modificada,
- poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con dicho al menos un segundo epítopo, y
- determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente al segundo epítopo.

45 La invención se refiere preferiblemente al menos a una modificación en al menos una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucle con al menos un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alergenitos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios, en la que la inmunoglobulina que contiene una región de bucle estructural no modificada no se une específicamente a dicho al

menos un antígeno.

El término "inmunoglobulinas", tal como se emplea en la presente (los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables), puede mostrar propiedades de unión mono-específica, o multiespecífica, o multivalente, al menos dos, preferiblemente al menos tres sitios de unión específica para epítopos, por ejemplo de antígenos, proteínas/moléculas efectoras. Las inmunoglobulinas según la invención también son fragmentos funcionales aceptados en la técnica, tales como Fc, Fab, scFv, dímeros monocatenarios de dominios CH/CL, Fv, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, dominios de cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como Fd, V λ , V κ , Vh) y la región constante de un anticuerpo intacto, tal como CH1, CH2, CH3, CH4, C λ y C κ , así como minidominios que consisten en dos cadenas beta de un dominio de inmunoglobulina conectadas por un bucle estructural.

Se entiende que el término "inmunoglobulina", las expresiones "inmunoglobulina modificada" o "inmunoglobulina según la invención" incluyen también un derivado de inmunoglobulinas. Un derivado es cualquier combinación de una o más inmunoglobulinas de la invención y/o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o minidominio de la inmunoglobulina de la invención puede estar condensado en cualquier posición posible de una o más proteínas distintas (tales como otras inmunoglobulinas, ligandos, proteínas de andamiaje, toxinas enzimáticas y similares). También puede obtenerse un derivado de la inmunoglobulina de la invención mediante la unión a otras sustancias a través de diversas técnicas químicas, tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, formación de enlaces disulfuro, etc.

Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas y anorgánicas o cualquiera de sus combinaciones (por ejemplo, PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también es una inmunoglobulina con la misma secuencia de aminoácidos pero preparada total o parcialmente a partir de aminoácidos no naturales o químicamente modificados.

Las moléculas modificadas según la presente invención serán útiles como proteínas autónomas, así como proteínas de fusión o derivados, de manera más típica condensadas de tal forma que sean parte de estructuras de anticuerpos más grandes o de moléculas de anticuerpos completos, o sus partes, tales como fragmentos Fab, fragmentos Fc, fragmentos Fv y otros. Es posible utilizar las proteínas modificadas para producir moléculas que sean mono-específicas, bio-específicas, tri-específicas e incluso que porten más especificidades al mismo tiempo, y será posible al mismo tiempo controlar y preseleccionar la valencia de la unión al mismo tiempo según los requisitos del uso previsto de dichas moléculas.

Según la presente invención, pueden introducirse regiones de unión al antígeno o sitios de unión al antígeno de todo tipo de alérgenos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios, en un bucle estructural de una estructura de anticuerpo dada.

El término "antígeno" según la presente invención significa moléculas o estructuras de las cuales se sabe que interaccionan o que son capaces de interaccionar con la región de bucle de CDR de inmunoglobulinas. Las regiones de bucles estructurales de la técnica anterior no interaccionan con antígenos sino que contribuyen a la estructura general y/o a la unión a moléculas efectoras.

Los términos y las expresiones "alérgenos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios" según la presente invención incluyen todos los alérgenos y los antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo, y fragmentos de dichas moléculas (en especial subestructuras denominadas en general "epítopos" (por ejemplo, epítopos de células B)), con la condición de que sean inmunológicamente pertinentes, es decir, que también sean reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales.

El término "epitopo" según la presente invención significa una estructura molecular que puede formar completamente una pareja de unión específica, o ser parte de una pareja de unión específica con el dominio de unión o a la inmunoglobulina de la presente invención.

Desde el punto de vista químico, un epitopo puede estar compuesto de un carbohidrato, un péptido, un ácido graso, una sustancia anorgánica o sus derivados, y cualquiera de sus combinaciones. Si un epitopo es un polipéptido, normalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferiblemente de 8 a 50 aminoácidos, y más preferiblemente entre aproximadamente 10-20 aminoácidos en el péptido. No existe un límite superior crítico para la longitud del péptido, que puede comprender casi la longitud completa de la secuencia del polipéptido. Los epítopos pueden ser epítopos lineales o conformacionales. Un epitopo lineal está formado por un único segmentop de una secuencia primaria de una cadena polipeptídica. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o estar solapados. Los epítopos conformacionales están formados por aminoácidos juntados por el plegamiento del polipéptido para formar una estructura terciaria, y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre sí en la secuencia lineal.

De modo más específico, los epítopos son al menos parte de una molécula diagnósticamente pertinente, es decir, la

ausencia o la presencia de un epitopo en una muestra se correlaciona cualitativa o cuantitativamente con una enfermedad o con el estado de salud o con un estado del proceso en la fabricación o con un estado ambiental y alimentario. Los epitopos también puede ser al menos parte de moléculas terapéuticamente pertinentes, es decir, moléculas que a las que puede dirigirse el dominio de unión específica que cambia el desarrollo de la enfermedad.

5 Los “alergenos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios” preferidos son los alergenos o los antígenos que ya han demostrado ser capaces o que son capaces de ser inmunológica o terapéuticamente pertinentes, en especial aquellos en los que se ha ensayado una eficacia clínica.

10 Por otra parte, según otro aspecto de la presente invención, también pueden introducirse otras capacidades de unión en las regiones de bucles estructurales, por ejemplo, capacidades de unión para moléculas pequeñas, tales como fármacos o enzimas, sitios catalíticos de enzimas o sustratos enzimáticos, o para un análogo de estado de transición de un sustrato enzimático.

15 Preferiblemente, el nuevo sitio de unión al antígeno en los bucles estructurales es extraño a la inmunoglobulina no modificada. Por tanto, se excluyen preferiblemente dianas, tales como receptores o moléculas efectoras Fc, de las moléculas de unión y de la especificidad de las inmunoglobulinas según la invención.

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

Según otra realización preferida de la presente invención, la modificación de al menos un nucleótido produce una sustitución, delección y/o inserción en la inmunoglobulina codificada por dicho ácido nucleico.

20 La modificación de dicha al menos una región de bucle puede producir una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos, preferiblemente una mutación puntual, un intercambio de bucles completos, más preferiblemente el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hasta 30 aminoácidos.

25 También se prefiere la mutación aleatoria dirigida a sitio. Con este método, uno o más restos aminoácidos específicos del bucle se intercambian o se introducen utilizando inserciones generadas al azar en dichos bucles estructurales. Como alternativa, se prefiere el uso de estrategias combinatorias.

30 Dicha al menos una región de bucle se muta o se modifica preferiblemente mediante métodos de mutagénesis aleatoria, semialeatoria o, en particular, aleatoria dirigida a sitio. Estos métodos pueden utilizarse para producir modificaciones de aminoácidos en posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En estos casos, las posiciones se eligen al azar, o los cambios de aminoácidos se realizan utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los restos pueden mutarse a alanina, denominado barrido de alanina. Estos métodos pueden acoplarse con estrategias de modificación más sofisticadas que emplean métodos de selección para seleccionar niveles mayores de diversidad de secuencia.

Un método preferido según la invención se refiere a la molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente que comprende al menos una unidad repetida de nucleótido que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3', o 5'-NNK-3'.

35 Tal como se conoce en la técnica, existe una diversidad de técnicas de selección que pueden utilizarse para la identificación y el aislamiento de proteínas con ciertas características y afinidades de unión que incluyen, por ejemplo, tecnologías de presentación, tales como presentación de fagos, presentación de ribosomas, presentación en la superficie celular y similares, tal como se describe a continuación. Los métodos para la producción y la selección de variantes de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Los métodos generales para la biología molecular, la expresión, la purificación y la selección de anticuerpos se describen en Antibody Engineering, editado por Duebel y Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, Curr. Opin. Chem. Biol., 5:683-689; Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2:339-376.

40 Un “bucle estructural” o “bucle que no es un bucle de CDR” según la presente invención debe entenderse de la siguiente manera: las inmunoglobulinas están formadas por dominios con un denominado plegamiento de la inmunoglobulina. En esencia, láminas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen fundamentalmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión al antígeno. Estos bucles se denominan bucles de CDR. Todos los demás bucles de los dominios del anticuerpo están contribuyendo a la estructura de la molécula y/o a la función efectora. Estos bucles se denominan en la presente bucles estructurales o bucles que no son bucles de CDR.

50 Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas (y que siempre incluyen, a través de la siguiente descripción entera, los fragmentos de inmunoglobulinas) pueden clonarse en células hospedantes, expresarse y ensayarse para sus especificidades de unión. Estas prácticas se realizan utilizando procedimientos muy conocidos, y se describe una diversidad de métodos que pueden utilizarse en la presente invención en

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.^{sup}.rd ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar dichas inmunoglobulinas. Los vectores de expresión comprenden generalmente una inmunoglobulina unida operablemente, que se coloca en una relación funcional, con secuencias control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o otros elementos. Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden producirse cultivando una célula hospedante transformada con un ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica las inmunoglobulinas modificadas, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de las inmunoglobulinas modificadas. Los métodos para introducir moléculas de ácidos nucleicos exógenos en un hospedante son muy conocidos en la técnica y variarán según el hospedante utilizado. Por supuesto pueden emplearse sistemas de expresión acelulares o sin células para la expresión de las inmunoglobulinas modificadas.

En una realización preferida de la presente invención, las inmunoglobulinas modificadas se purifican o se aíslan después de la expresión. Las inmunoglobulinas modificadas pueden aislarse o purificarse en una diversidad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación convencionales incluyen técnicas cromatográficas, electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis, de filtración, de concentración y de cromatoforfoque. A menudo la purificación puede ser habilitada por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, pueden purificarse anticuerpos utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión de GST, una cromatografía de afinidad de Ni⁺² si se emplea un marcador de His, o un anticuerpo antimarcador inmovilizado si se utiliza un marcador. Para una guía general de técnicas de purificación adecuadas, véase Antibody Purification: Principles and Practice, 3.^{sup}.rd ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. Por supuesto, también es posible expresar las inmunoglobulinas modificadas según la presente invención sobre la superficie de un hospedante, en particular sobre la superficie de una célula bacteriana, de insecto o de levadura, o sobre la superficie de fagos o virus.

Las inmunoglobulinas modificadas pueden seleccionarse utilizando una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a los que se emplean en ensayos *in vitro*, *in vivo* y en ensayos basados en células, y tecnologías de selección. En los procedimientos de selección pueden emplearse tecnologías de selección automática y de alta capacidad de procesamiento. La selección puede utilizar una pareja de fusión o marcador, por ejemplo una enzima, un marcador inmunológico, un marcado isotópico, o un marcador de molécula pequeña, tal como un tinte fluorescente o colorimétrico, o una molécula luminogénica.

En una realización preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las inmunoglobulinas se seleccionan en un ensayo *in vitro*. En una realización preferida, el anticuerpo se selecciona según su funcionalidad, por ejemplo por su capacidad para catalizar una reacción o su afinidad de unión por su diana.

Los ensayos pueden emplear una diversidad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos.

Tal como se sabe en la técnica, un subconjunto de métodos de selección son en los que se seleccionan miembros favorables de un banco. Los métodos se denominan en la presente "métodos de selección", y estos métodos pueden emplearse en la presente invención para seleccionar inmunoglobulinas modificadas. Cuando se seleccionan bancos de inmunoglobulinas utilizando un método de selección, sólo los miembros del banco que son favorables, es decir, que cumplen ciertos criterios de selección, se propagan, se aíslan y/o se observan. Tal como se apreciará, debido a que sólo se observan los variantes más adecuados, estos métodos permiten la selección de bancos que son mayores que los que se seleccionan mediante métodos que ensayan la aptitud de los miembros del banco individualmente. La selección puede realizarse mediante cualquier método, técnica, o pareja de fusión que enlace, covalente o no covalentemente, el fenotipo de inmunoglobulinas con su genotipo, es decir, la función de un anticuerpo con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de la presentación de fagos como método de selección puede realizarse por la fusión de miembros del banco con la proteína del gen III. De esta manera, la selección o el aislamiento de inmunoglobulinas modificadas que cumplen algunos criterios, por ejemplo afinidad de unión con la diana de la inmunoglobulina, también selecciona o aísla el ácido nucleico que las codifican. Tras haber sido aislado, el gen o genes que codifican las inmunoglobulinas modificadas puede entonces amplificarse. Este proceso de aislamiento y amplificación, denominado inmunoadsorción ("panning"), puede repetirse, permitiendo que el banco se enriquezca en los variantes de anticuerpos favorables. La secuenciación de ácidos nucleicos del ácido nucleico unido permite, en último término, la identificación del gen.

En la técnica se conoce una diversidad de métodos de selección que pueden utilizarse en la presente invención para seleccionar bancos de inmunoglobulinas. Estas incluyen, pero no se limitan a la presentación de fagos (Phage display of peptides and antibodies: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, Calif.; Lowman *et al.*, 1991, Biochemistry, 30:10832-10838; Smith, 1985, Science, 228:1315-1317) y sus derivados, tales como infección de fagos selectiva (Malmberg *et al.*, 1997, J. Mol. Biol., 273:544-551), fagos selectivamente infecciosos (Kreber *et al.*, 1997, J. Mol. Biol., 268:619-630), e inmunoadsorción de infectividad retrasada (Benhar *et al.*, 2000, J. Mol. Biol., 301:893-904), presentación en la superficie de células (Wittrup, 2001, Curr. Opin. Biotechnol.,

12:395-399), tal como presentación sobre bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, Nat. Biotechnol., 15:29-34; Georgiou *et al.*, 1993, Trends Biotechnol., 11:6-10; Lee *et al.*, 2000, Nat. Biotechnol., 18:645-648; Jun *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol., 16:576-580), levaduras (Boder y Wittrup, 2000, Methods Enzymol., 328:430-444; Boder y Wittrup, 1997, Nat. Biotechnol., 15:553-557), y células de mamífero (Whitehorn *et al.*, 1995, Bio/technology, 13:1215-1219), así como tecnologías de presentación *in vitro* (Amstutz *et al.*, 2001, Curr. Opin. Biotechnol., 12:400-405), tales como presentación de polisomas (Mattheakis *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:9022-9026), presentación de ribosomas (Hanes *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942), presentación de ARNm (Roberts y Szostak, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12302; Nemoto *et al.*, 1997, FEBS Lett., 414:405-408), y el sistema de presentación de inactivación de ribosomas (Zhou *et al.*, 2002, J. Am. Chem. Soc., 124, 538-543).

Otros métodos de selección que pueden ser útiles en la presente invención incluyen métodos que no se basan en la presentación, tales como métodos *in vivo* que incluyen, pero no se limitan a la expresión periplásmica y la selección citométrica (Chen *et al.*, 2001, Nat. Biotechnol., 19:537-542), el ensayo de complementación de fragmentos de anticuerpos (Johnsson y Varshavsky, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:12141-12146), y la selección de dos híbridos de levaduras (Fields y Song, 1989, Nature, 340:245-246) utilizado en el modo de selección (Visintin *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11724-11728). En una realización alternativa, la selección puede realizarse mediante una pareja de fusión que se une a una secuencia específica sobre el vector de expresión, uniendo covalente o no covalentemente la pareja de fusión y el miembro del banco de variantes de Fc asociado con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, los documentos PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; y PCT WO 02/07466 describen dicha pareja de fusión y técnica que puede utilizarse en la presente invención. En una realización alternativa, puede producirse la selección *in vivo* si la expresión del anticuerpo imparte alguna ventaja de crecimiento, reproducción o supervivencia a la célula.

Un subconjunto de métodos de selección denominados métodos de "evolución directa" son los que incluyen el apareamiento o la reproducción de secuencias favorables durante la selección, a veces con la incorporación de nuevas mutaciones. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables en un banco, y pueden aumentar la diversidad de secuencias que se seleccionan. En la técnica se conoce una diversidad de métodos de evolución dirigida que pueden utilizarse en la presente invención para seleccionar variantes de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan al reordenamiento de ADN (documento PCT WO 00/42561 A3; documento PCT WO 01/70947 A3), reordenamiento de exones (patente de EEUU nº 6.365.377; Kolkman y Stemmer, 2001, Nat. Biotechnol., 19:423-428), reordenamiento de familias (Cramer *et al.*, 1998, Nature, 391:288-291; patente de EEUU nº 6.376.246), RACHITT.TM. (Coco *et al.*, 2001, Nat. Biotechnol., 19:354-359; documento PCT WO 02/06469), STEP y cebado aleatorio de recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, Nat. Biotechnol., 16:258-261; Shao *et al.*, 1998, Nucleic Acids Res., 26:681-683), ensamblado de genes mediado por exonucleasas (patente de EEUU nº 6.352.842; patente de EEUU nº 6.361.974), Gene Site Saturation Mutagenesis.TM. (patente de EEUU nº 6.358.709), Gene Reassembly.TM. (patente de EEUU nº 6.358.709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi *et al.*, Gene, 236:159-167), reordenamiento de ADN monocatenario (Kikuchi *et al.*, 2000, Gene, 243:133-137), y la tecnología de modificación de anticuerpos de evolución dirigida AMESystem.TM. (Applied Molecular Evolution) (patente de EEUU nº 5.824.514; patente de EEUU nº 5.817.483; patente de EEUU nº 5.814.476; patente de EEUU nº 5.763.192; patente de EEUU nº 5.723.323).

En una realización preferida, se seleccionan variantes de anticuerpos utilizando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para estos ensayos, generalmente se añaden de forma exógena inmunoglobulinas modificadas purificadas o no purificadas, de modo que las células se exponen a las inmunoglobulinas individuales o a agrupaciones de inmunoglobulinas que pertenecen a un banco. Estos ensayos se basan generalmente, pero no siempre, en la función de la inmunoglobulina; es decir, la capacidad del anticuerpo de unirse a su diana y mediar en algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo la función efectora, la inhibición de la unión al ligando/receptor, la apoptosis y similares. Estos ensayos a menudo implican controlar la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, el cambio en la morfología celular, o la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o un gen indicador. Por ejemplo, estos ensayos pueden medir la capacidad de los variantes de anticuerpos para producir ADCC, ADCP, o CDC. Para algunos ensayos es posible que sea necesario añadir otras células o componentes, además de las células diana, por ejemplo el complemento del suero, o células efectoras, tales como monocitos de sangre periférica (PMBC), células NK, macrófagos, y similares. Estas otras células pueden proceder de cualquier organismo, preferiblemente seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Las inmunoglobulinas pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar en el ataque a las células diana por células inmunológicas que se han añadido al ensayo. Los métodos para controlar la muerte o la viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de tintes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos, y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción de caspasa pueden permitir medir la apoptosis, y la captación o la liberación de sustratos radiactivos o tintes fluorescentes, tales como azul de alamar, puede permitir controlar el crecimiento o la activación celular. En una realización preferida, puede utilizarse el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA.RTM. (Perkin Elmer, MA). Como alternativa, las células diana muertas o dañadas pueden controlarse midiendo la liberación de uno o más componentes

intracelulares naturales, por ejemplo, lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede actuar como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede controlarse ensayando genes naturales o inmunoglobulinas que pueden estar sobreexpresados, por ejemplo puede medirse la liberación de ciertas interleuquinas, o como alternativa la lectura de salida puede realizarse a través de una construcción indicadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medición de cambios morfológicos de las células en respuesta a la presencia de inmunoglobulinas modificadas. Los tipos de células para estos ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y puede emplearse una diversidad de líneas celulares que son conocidas en la técnica. Como alternativa, se realizan selecciones basadas en células utilizando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican los variantes. Es decir, no se añaden de modo exógeno variantes de anticuerpos a las células. Por ejemplo, en una realización, la selección basada en células utiliza la presentación en la superficie de células. Puede emplearse una pareja de fusión que permite la presentación de inmunoglobulinas modificadas sobre la superficie de células (Wittrup, 2001, Curr. Opin. Biotechnol., 12:395-399).

En una realización preferida, la inmunogenicidad de las inmunoglobulinas modificadas puede determinarse de modo experimental utilizando uno o más ensayos basados en células. En una realización preferida, se emplean ensayos de activación de células T *ex vivo* para cuantificar la inmunogenicidad de modo experimental. En este método, las células presentadoras de antígenos y células T sin estimular de donantes emparejados se exponen a un péptido o a un anticuerpo completo de interés una o más veces. Después puede detectarse la activación de las células T utilizando una serie de métodos, por ejemplo, controlando la producción de citoquinas o midiendo la captación de timidina tritiada. En la realización más preferida, la producción de interferón gamma se controla utilizando ensayos Elispot (Schmittel *et al.*, 2000, J. Immunol. Meth., 24:17-24).

Las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden caracterizarse en experimentos con células, tejidos, y organismos completos. Tal como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se ensayan en animales que incluyen, pero no se limitan a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento de una enfermedad o un modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, la toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Los productos terapéuticos a menudo se ensayan en ratones que incluyen, pero no se limitan a ratones atímicos, ratones SCID, ratones de xenoinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo con genes activados e inactivados). Esta experimentación puede proporcionar datos valiosos para la determinación del potencial de un anticuerpo para ser utilizado como producto terapéutico. Puede utilizarse cualquier organismo, preferiblemente mamíferos, para el ensayo. Por ejemplo, debido a su similitud genética con seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por tanto pueden utilizarse para ensayar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética u otras propiedades de las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En último término son necesarios ensayos en seres humanos para la aprobación como fármacos, y así por supuesto se contemplan estos experimentos. Por tanto, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden ensayarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden utilizarse en una amplia gama de productos de anticuerpos. En una realización, el variante de anticuerpo de la presente invención se utiliza para terapia o profilaxis, para un uso preparativo o analítico, como un producto de diagnóstico, un compuesto industrial o un reactivo de investigación, preferiblemente un producto terapéutico. El variante de anticuerpo puede utilizarse en una composición de anticuerpos que sean monoclonales o policlonales. En una realización preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para destruir células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo células de cáncer. En una realización alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se utilizan para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana, por ejemplo antagonizando una citoquina o un receptor de citoquina. En una realización alternativa preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se emplean para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno diana y destruir las células diana que portan el antígeno diana. En una realización alternativa preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se emplean para bloquear, antagonizar, o agonizar factores del crecimiento o receptores de factores del crecimiento, y destruir las células diana que portan o que necesitan el antígeno diana. En una realización alternativa preferida, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se emplean para bloquear, antagonizar, o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

Las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden utilizarse para diversos objetivos terapéuticos. En una realización preferida, un anticuerpo que comprende las inmunoglobulinas modificadas se administra a un paciente para tratar un trastorno específico. Un "paciente" para los objetivos de la presente invención incluye seres humanos y otros animales, preferiblemente mamíferos y lo más preferiblemente seres humanos. Un "trastorno específico" en la presente significa un trastorno que puede mejorarse mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

En una realización, una inmunoglobulina modificada según la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Como alternativa, la inmunoglobulina modificada según la

5 presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos que incluyen, pero no se limitan a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasas, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. Las inmunoglobulinas modificadas pueden administrarse al mismo tiempo que uno o más regímenes terapéuticos distintos. Por ejemplo, un variante de anticuerpo de la presente invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o ambas quimioterapia y terapia de radiación. En una realización, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención pueden administrarse junto con uno o más anticuerpos, que pueden comprender o no un variante de anticuerpo de la presente invención. Según otra realización de la invención, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y una o más terapias anticáncer distintas se emplean para tratar células de cáncer *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y, en particular, el trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención puedan emplearse en combinación con otras técnicas terapéuticas, tales como la cirugía.

15 Puede utilizarse una diversidad de otros agentes terapéuticos para la administración con las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención. En una realización, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente antiangiogénico, que es un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, una fusión Fc, o una citoquina, que se une a un factor del crecimiento o a un receptor de un factor del crecimiento implicado en la estimulación de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en la presente es un anticuerpo que se une al factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una realización alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un agente terapéutico que induce o potencia una respuesta inmunológica adaptativa, por ejemplo un anticuerpo que se dirige a CTLA-4. En una realización alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de la tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe, hasta cierto grado, la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención se administran con una citoquina. Una "citoquina", tal como se emplea en la presente, es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares, que incluyen las quimioquinas.

30 Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan las inmunoglobulinas modificadas de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de los variantes de anticuerpos de la presente invención se preparan para su conservación mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., ed., 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Las formulaciones que se van a utilizar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra con facilidad mediante una filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las inmunoglobulinas modificadas y otros agentes terapéuticamente activos descritos en la presente también pueden formularse como inmunoliposomas y/o encerrarse en microcápsulas.

40 La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención, preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril, puede realizarse en una diversidad de formas que incluyen, pero no se limitan a por vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, la tecnología inhalable AERx™ disponible en el mercado en Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance™ disponible en el mercado en Inhale Therapeutics), vaginal, parenteral, rectal, o intraocular.

45 Tal como se emplea en la presente, la expresión "se une específicamente" se refiere a una reacción de unión que depende del ligando cognado de interés en una población heterogénea de moléculas. Así, bajo condiciones indicadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de una inmunoglobulina), el anticuerpo especificado se une a su diana "concreta" y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra. Comparables a las CDR de los anticuerpos, las regiones de bucles estructurales modificadas son restos de proteínas de unión al antígeno o a moléculas y no son propiamente antígenos.

50 La expresión "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia codificadora deseada y secuencias control operablemente unidas, de forma que hospedantes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para realizar la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN pertinente puede también integrarse en el cromosoma del hospedante.

55 Según una realización preferida de la presente invención, el sistema de expresión comprende un vector. Puede utilizarse cualquier vector de expresión conocido en la técnica para este objetivo, según sea apropiado.

La inmunoglobulina modificada se expresa preferiblemente en un hospedante, preferiblemente en una bacteria, una levadura, una célula vegetal, una célula animal, o en una planta o un animal.

- Puede utilizarse una amplia variedad de células hospedantes apropiadas para expresar la inmunoglobulina modificada que incluyen, pero no se limitan a células de mamífero (células animales), células vegetales, bacterias (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), células de insecto, y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*). Por ejemplo, una diversidad de líneas celulares que pueden utilizarse en la presente invención se describe en el catálogo de líneas celulares ATCC, disponible en the American Type Culture Collection. Además, también pueden utilizarse plantas y animales como hospedantes para la expresión de la inmunoglobulina según la presente invención. La expresión, así como los módulos o vectores de transfección, puede seleccionarse según el hospedante utilizado.
- Por supuesto, también pueden utilizarse sistemas de expresión de proteínas sin células o acelulares. Las plataformas de expresión de proteínas de transcripción/traducción *in vitro*, que producen cantidades suficientes de proteínas, ofrecen muchas ventajas de una expresión de proteínas sin células, eliminando la necesidad de laboriosas etapas corriente arriba y abajo (por ejemplo, transformación de células hospedantes, cultivos, o lisis) asociadas generalmente con los sistemas de expresión basados en células.
- Un método para preparar una inmunoglobulina, o una preparación farmacéutica de ésta, comprende al menos una modificación en una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión de dicha inmunoglobulina a un epítipo de un antígeno, en el que la inmunoglobulina no modificada no se une significativamente a dicho epítipo, que comprende las etapas de:
- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que comprende al menos una región de bucle,
 - modificar al menos un resto nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucles,
 - trasladar dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
 - expresar dicha inmunoglobulina modificada,
 - poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con un epítipo, y
 - determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une a dicho epítipo, y
 - proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une a dicho epítipo, y opcionalmente acabarla en una preparación farmacéutica.
- En particular, un método para preparar una inmunoglobulina multiespecífica que se une específicamente al menos a una primera molécula, o una preparación farmacéutica de esta, que comprende al menos una modificación en al menos una región de bucle estructural de dicha inmunoglobulina, y determinar la unión específica de dicha al menos una región de bucle con al menos una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios, en el que la inmunoglobulina que contiene una región de bucle estructural no modificada no se une específicamente a dicha al menos segunda molécula, que comprende las etapas de:
- proporcionar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina que se une específicamente al menos a una primera molécula que comprende al menos una región de bucle estructural,
 - modificar al menos un resto nucleótido de al menos una de dichas regiones de bucles codificadas por dicho ácido nucleico,
 - trasladar dicho ácido nucleico modificado en un sistema de expresión,
 - expresar dicha inmunoglobulina modificada,
 - poner en contacto la inmunoglobulina modificada expresada con dicha al menos una segunda molécula, y
 - determinar si dicha inmunoglobulina modificada se une específicamente a la segunda molécula, y
 - proporcionar la inmunoglobulina modificada que se une específicamente a dicha al menos una segunda molécula, y opcionalmente acabarla en una preparación farmacéutica.
- Se prefiere la modificación de más de una especificidad en un miembro de una pareja de unión específica (Kufer *et al.* (2004), Trends in Biotechnology, vol. 22, pp. 238-244).
- Se han realizado numerosos intentos de producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos. Un problema en la producción de anticuerpos biespecíficos preparados a partir de dos cadenas polipeptídicas diferentes (cadena pesada y ligera) es la necesidad de expresar cuatro cadenas diferentes (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) en una célula que produzca una serie de diversas

combinaciones de moléculas que deben separarse de la molécula biespecífica deseada en la mezcla. Debido a su similitud, la separación de estas moléculas resulta difícil y cara. Se ha empleado una serie de técnicas para minimizar la aparición de dichos apareamientos no deseados (Carter (2001), *Journal of Immunological Methods*, vol. 248, pp. 7-15).

- 5 Una solución al problema es la producción de una cadena polipeptídica con dos especificidades, por ejemplo, dos scFv unidos entre sí, o la producción de los denominados diacuerpos. Estas moléculas han demostrado ser muy diferentes del plegamiento de una molécula natural y son muy difíciles de producir (LeGall *et al.* (2004), *Protein Engineering, Design & Selection*, vol. 17, pp. 357-366).

- 10 Otro problema del diseño actual de anticuerpos biespecíficos es el hecho de que incluso si los anticuerpos de origen se unen bivalentemente a su respectiva pareja de unión (por ejemplo, IgG), el anticuerpo biespecífico resultante es monovalente para cada una de las parejas de unión respectivas.

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

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

- 20 También puede producirse como una molécula de tipo anticuerpo (es decir, preparada a partir de dos cadenas polipeptídicas), debido al hecho de que la segunda especificidad está localizada en la parte no variable de la molécula, y no son necesarias dos cadenas pesadas diferentes o cadenas ligeras diferentes. Así, no existe la posibilidad de un apareamiento erróneo de las dos cadenas.

- 25 Un anticuerpo de la presente invención puede consistir en una cadena pesada y una cadena ligera, que forman juntas una región variable que se une a una pareja de unión específica, y la segunda especificidad puede formarse mediante un bucle modificado de cualquiera de los bucles estructurales de la cadena pesada o de la cadena ligera. El sitio de unión también puede estar formado por más de un bucle que no es un bucle de CDR, que puede ser un vecino estructural (sobre la cadena pesada o sobre la cadena ligera o sobre ambas cadenas).

El anticuerpo modificado o derivado puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab).

Puede unirse de modo monovalente o multivalente a parejas de unión, o incluso con diferente valencia para las diferentes parejas de unión, dependiendo del diseño.

- 30 Puesto que existe una serie de diversos bucles disponibles para la selección y el diseño de un sitio de unión específica en las regiones que no son CDR de cadenas pesadas y ligeras, es posible diseñar derivados de anticuerpos con incluso más de dos especificidades sin los problemas mencionados anteriormente.

Los dominios de unión específica dentro de una cadena polipeptídica pueden estar conectados con o sin un conector peptídico.

- 35 Algunas clases de anticuerpos pueden considerarse como multiespecíficas, en particular biespecíficas, por su naturaleza: se unen a un antígeno (que generalmente es, por ejemplo, una estructura extraña o una estructura asociada a cáncer) con la región variable, y se unen a moléculas efectoras Fc con la parte Fc (por ejemplo, receptores de Fc sobre diversas células inmunológicas o proteínas del complemento), permitiendo con ello efectos tales como ADCC, ADCCP o CDC.

- 40 Las moléculas efectoras Fc son unidas por la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina (para IgG1 consiste en los dominios CH2 y CH3), y se han descrito una serie de métodos para optimizar la función efectora mejorando la unión de la parte Fc de una molécula de anticuerpo mediante técnicas de glicosmodificación (documento US 6.602.684) o mediante modificación de proteínas directamente en el Fc (documento US 2005/0054832) o indirectamente mediante una modificación fuera del Fc (documento US 2005/02444403). Ambas, la unión de la
- 45 región Fc al receptor de Fc y/o la unión a proteínas del complemento, tales como Cq1, ha sido alterada mediante estas técnicas. Habitualmente se busca mejorar la afinidad de unión a dichas moléculas efectoras Fc, puesto que esto se correlaciona con unas funciones efectoras mejoradas.

- 50 Con la presente invención es posible diseñar un anticuerpo que se une a moléculas efectoras Fc fuera de la región de unión de Fc natural. Pueden seleccionarse bucles modificados en dominios de anticuerpos distintos de los bucles implicados en la unión de moléculas efectoras de Fc "natural" a partir de un banco, o pueden diseñarse para que se unan a una o más moléculas efectoras de Fc. Un anticuerpo con dichos sitios de unión a moléculas efectoras Fc adicionales tendrá una avidéz más fuerte por cierta molécula efectora Fc o célula efectora que presente una molécula efectora Fc y, por tanto, puede tener un efecto aún más potente que los anticuerpos glicosmodificados o

regiones Fc mejoradas de otra forma. Sin embargo, para ciertas realizaciones de la presente invención, las características efectoras de un anticuerpo dado que se va a modificar no deberían cambiarse directamente sino que deben permanecer sin altera por la modificación en el bucle estructural según la presente invención.

5 Los fragmentos de anticuerpos tienen ciertas ventajas comparados con los anticuerpos completos. Los fragmentos habitualmente tienen buenas propiedades de biodistribución y pueden producirse con más facilidad. Sin embargo, la mayoría de los diseños de fragmentos de anticuerpos carecen de funciones efectoras y tiene una semivida *in vivo* corta (Holliger P., *et al.*, Nat. Biotechnol. (2005), 23:1126-1136).

10 Ninguno de los dominios CH1, C κ o C λ median en funciones efectoras, que es la razón por la que los Fab no muestran ADCC, ADCCP o CDC. El documento WO 02/44215 describe moléculas de unión que consisten en el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo y un péptido que une moléculas efectoras Fc. De tal manera puede construirse un fragmento de anticuerpo que muestra funciones efectoras. El péptido se incorpora en la molécula de unión en una posición que no destruye la unión del antígeno ni la capacidad del péptido de unirse a una molécula efectora Fc.

15 Sin embargo, según la presente invención, la unión a moléculas efectoras Fc puede realizarse con dominios de inmunoglobulinas modificados que se han seleccionado para la unión a moléculas efectoras Fc de bancos de secuencias de bucles aleatorias dentro de un andamiaje fijo de un dominio de inmunoglobulina. Por tanto, es posible seleccionar secuencias de bucle específicas que no se unan a moléculas efectoras Fc fuera del andamiaje del dominio de Ig. Los polipéptidos que resultan de la presente invención por tanto consisten preferiblemente en más de 100 aminoácidos.

20 Para seleccionar funciones efectoras potenciales de dichos dominios según la presente invención pueden seleccionarse bancos de dominios CH1, C κ o C λ mutantes para la unión a receptores Fc y/o factores del complemento, tales como Clq.

25 Para aumentar la semivida *in vivo* de una molécula que consiste o que contiene dicho dominio (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, C κ o C λ), la unión a FcRn puede seleccionarse en bancos de mutantes, por ejemplo, dominios C κ appa o C λ ambda según la presente invención.

30 Pueden proporcionarse receptores FcRn para la selección sobre la superficie de células que expresan de forma natural los respectivos receptores, o mediante la expresión y la purificación de la parte extracelular del respectivo receptor. Para los fines de esta invención, una primera selección en FcRn puede seleccionar dominios mutantes que después pueden ensayarse *in vitro* y caracterizarse aún más en experimentos FACS mediante la unión a células que expresan el receptor FcRn. También pueden caracterizarse aún más mediante una clasificación de afinidad de la unión a diversos FcRn recombinantes, isoformas y alotipos, por ejemplo con técnicas de resonancia de plasmón de superficie.

Según una realización preferida de la presente invención, la inmunoglobulina es de origen humano o murino.

35 Puesto que la inmunoglobulina modificada puede emplearse para diversos fines, en particular en composiciones farmacéuticas, la inmunoglobulina es preferiblemente de origen humano o murino. Por supuesto, la inmunoglobulina humana también puede ser una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

Según otra realización preferida de la presente invención, la inmunoglobulina humana se selecciona del grupo que consiste en IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM.

40 La inmunoglobulina murina se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 e IgM.

La inmunoglobulina modificada puede derivarse de una de las clases de inmunoglobulinas indicadas anteriormente.

La inmunoglobulina comprende preferiblemente una cadena pesada y/o ligera de la inmunoglobulina, o una parte de esta.

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

45 La inmunoglobulina según la presente invención comprende preferiblemente al menos un dominio variable de la inmunoglobulina, o una parte de este que incluye un minidominio.

Un dominio constante es una unidad de plegamiento de la inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de inmunoglobulina, también denominada dominio de la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, CH4, C κ , C λ).

50 Un dominio variable es una unidad de plegamiento de la inmunoglobulina de la parte variable de una

inmunoglobulina, también denominada dominio de la región variable (por ejemplo, Vh o Vl).

Una inmunoglobulina preferida según la invención consiste en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte de este que incluye un minidominio, con al menos una región de bucle, y se caracteriza porque dicha al menos una región de bucle comprende al menos una modificación de un aminoácido que forma al menos una región de bucle modificada, en la que dicha al menos una región de bucle modificada se une específicamente con al menos un epítopo de un antígeno.

Según una realización preferida, el dominio constante se selecciona del grupo de CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C y sus combinaciones.

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

Todas las numeraciones de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas se realizan según el esquema de numeración de IMGT (IMGT, el sistema de información internacional ImMunoGeneTics system@imgt.cines.fr; <http://imgt.cines.fr>; Lefranc *et al.*, 1999, Nucleic Acids Res., 27:209-212; Ruiz *et al.*, 2000, Nucleic Acid Res., 28:219-221; Lefranc *et al.*, 2001, Nucleic Acids Res., 29:207-209; Lefranc *et al.*, 2003, Nucleic Acids Res., 31:307-310; Lefranc *et al.*, 2005, Dev. Comp. Immunol., 29:185-203).

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

Según una realización preferida de la presente invención, las regiones de bucles estructurales del dominio variable de la inmunoglobulina de origen murino comprenden los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 92 a 101.

Las regiones de aminoácidos identificadas anteriormente de las respectivas inmunoglobulinas comprenden regiones de bucles que se van a modificar.

La inmunoglobulina según la invención preferiblemente es de origen de camello.

Los anticuerpos de camello comprende sólo una cadena pesada y tienen la misma afinidad de antígeno que los anticuerpos normales que consisten en cadenas ligeras y pesadas. Por consiguiente, los anticuerpos de camello son mucho más pequeños que, por ejemplo, los anticuerpos humanos, lo cual les permite penetrar tejidos densos para alcanzar el antígeno, mientras que proteínas más grandes no pueden. Además, la comparativa simplicidad, la alta afinidad y especificidad, y el potencial para alcanzar e interactuar con sitios activos, hace que los anticuerpos de cadena pesada de camello presenten ventajas sobre los anticuerpos comunes en el diseño, la producción y la aplicación de compuestos clínicamente valiosos.

La inmunoglobulina de origen de camello comprende preferiblemente al menos un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2 y CH3.

Según una realización preferida de la presente invención, la unión específica de la inmunoglobulina modificada a la molécula se determina mediante un ensayo de unión seleccionado del grupo que consiste en ensayos inmunológicos, preferiblemente ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de resonancia de plasmón de superficie, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de transferencia NOE (trNOE), ensayos competitivos, ensayos de unión de tejidos, ensayos de unión de células vivas, y ensayos de extractos celulares.

Los ensayos de unión pueden realizarse utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a ensayos basados en FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y en BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), AlphaScreen.TM. (ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado), ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), SPR (resonancia de plasmón de superficie, también conocido como BIACORE.RTM.), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel, y cromatografía, incluyendo filtración en gel. Estos y otros métodos pueden aprovechar alguna pareja de fusión o marcador.

La inmunoglobulina modificada preferiblemente se conjuga con un marcador seleccionado del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

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

Se prefiere combinar molecularmente al menos un dominio de anticuerpo modificado (= unión de la pareja específica a través de las secuencias no variables o bucle estructural) con al menos otra molécula de unión que puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo modificado.

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

Las regiones de bucles de las inmunoglobulinas modificadas pueden unirse específicamente a cualquier tipo de moléculas de unión, en particular a moléculas proteicas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas pequeñas, moléculas anorgánicas. Por supuesto, las inmunoglobulinas modificadas pueden comprender al menos dos regiones de bucles, pudiendo unirse específicamente cada una de las regiones de bucles con otras moléculas o epitopos.

Según una realización preferida de la presente invención, la molécula que se une a la región de bucle estructural modificada se selecciona del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, en particular EpCAM, glicoproteína-72 asociada a tumores (TAG-72), antígeno CA 125 asociado a tumores, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno asociado a tumores que expresa el carbohidrato relacionado con Lewis Y, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18 y antígeno asociado a tumores citoqueratinicos, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, fluoresceína, lisozima, receptor 9 de tipo Toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; TNF-alfa, TNFbeta2, TNF.alfa., TNFalfabeta, TNF-RI, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor-1 TRAIL, receptor de adenosina A1, receptor de linfotóxina beta, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa5, integrina alfa6, integrina alfav, alfaVbeta3 integrina, FGFR-3, factor del crecimiento de queratinocitos, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de células T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina1, BLYS (estimulador de linfocitos B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelina, VLA-4, carbohidratos, tales como antígenos de los grupos sanguíneos y carbohidratos relacionados, glicosilación-galili, gastrina, receptores de gastrina, carbohidratos asociados a tumores, hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor alfa/beta de células T, E-selectina, digoxina, fosfatas alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, receptor de transferrina, heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la envuelta gH del citomegalovirus humano (HCMV), gp120 de VIH, HCMV, virus respiratorio sincitial RSV F, Fgp de RSVF, VNRintegrina, gp120 de Hep B, CMV, gpIIbIIIa, bucle V3 de gp120 IIIB de VIH, Fgp del virus respiratorio sincitial (RSV), glicoproteína gD del virus del Herpes simplex (HSV), glicoproteína gB de HSV, glicoproteína de la envuelta gB de HCMV, toxina de *Clostridium perfringens* y sus fragmentos.

La inmunoglobulina modificada según la presente invención puede unirse preferiblemente a una de las moléculas descritas anteriormente. Estas moléculas también comprenden alérgenos.

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

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

La región CH3 comprende SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18, cuando EpCam se une a dicha inmunoglobulina, SEQ ID NO:20, cuando la fluoresceína se une a dicha inmunoglobulina, SEQ ID NO:22, 24, 26, 28, 30 o 32, cuando la lisozima se une a dicha inmunoglobulina, SEQ ID NO:34, 36, 38 o 40, cuando TLR9 se une a dicha inmunoglobulina, y SEQ ID NO:42, cuando la lisozima y/o la eritropoyetina se une a dicha inmunoglobulina.

Una inmunoglobulina se caracteriza porque comprende SEQ ID NO:44 o SEQ ID NO:46, cuando la lisozima y gp41 se unen a dicha inmunoglobulina.

La inmunoglobulina modificada preferiblemente se conjuga con un marcador o una molécula indicadora seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos,

marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y sus mezclas.

Las inmunoglobulinas modificadas conjugadas con marcadores según se especificó anteriormente pueden utilizarse, por ejemplo, en métodos de diagnóstico.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina según la presente invención para la preparación de una vacuna para la inmunización activa. En la presente, la inmunoglobulina se utiliza como sustancia fármaco antigénica para formular una vacuna, o se utiliza para pescar o capturar estructuras antigénicas para su uso en la formulación de vacunas.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una inmunoglobulina según la presente invención para la preparación de un banco de proteínas de inmunoglobulinas.

Otro aspecto se refiere a un método para unir y/o detectar específicamente una molécula, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada según la presente invención con una muestra de ensayo sospechosa de contener dicha molécula; y

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

Otro aspecto se refiere a un método para aislar específicamente una molécula, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada según la presente invención con una muestra que contiene dicha molécula;

(b) separar el complejo de inmunoglobulina/molécula específico formado; y

20 (c) opcionalmente aislar la molécula de dicho complejo.

Las inmunoglobulinas según la presente invención pueden utilizarse para aislar específicamente moléculas de una muestra. Si se emplean inmunoglobulinas multiespecíficas puede aislarse más de una molécula de una muestra. Resulta especialmente ventajoso emplear las inmunoglobulinas modificadas en dichos métodos porque permiten, por ejemplo, generar una matriz que tiene una superficie homogénea con cantidades definidas de parejas de unión (es decir, inmunoglobulinas modificadas) inmovilizadas sobre ella, que son capaces de unirse a las moléculas que se van a aislar. En contraste con esto, si se emplean parejas de unión monoespecíficas no puede generarse una matriz homogénea, porque las parejas de unión individuales no se unen con la misma eficacia a la matriz.

25 Otro aspecto se refiere a un método para dirigir un compuesto a una diana, que comprende las etapas de:

30 (a) poner en contacto una inmunoglobulina modificada según la presente invención capaz de unirse específicamente a dicho compuesto;

(b) transportar el complejo de inmunoglobulina/compuesto hasta la diana.

Las inmunoglobulinas modificadas según la presente invención pueden utilizarse para transportar al menos un compuesto unido a las CDR y/o regiones de bucles modificadas, hasta una diana. Estas inmunoglobulinas pueden utilizarse para transportar sustancias terapéuticas hasta un sitio preferido de acción en el desarrollo del tratamiento de una enfermedad.

35

Otro aspecto se refiere a un banco de proteínas que comprende una inmunoglobulina según la presente invención.

Los métodos preferidos para construir un banco pueden encontrarse anteriormente y en los ejemplos. Un banco puede utilizarse para identificar inmunoglobulinas que se unen a una molécula diferenciada.

40 En particular, la presente invención se refiere al uso de un banco de proteínas que comprende una inmunoglobulina según la presente invención para el diseño de derivados de inmunoglobulinas. Una inmunoglobulina existente puede cambiarse para introducir sitios de unión al antígeno en cualquier dominio o minidominio utilizando un banco de proteínas del respectivo dominio de al menos 10, preferiblemente 100, más preferiblemente 1000, más preferiblemente 10000, más preferiblemente 100000, más preferiblemente más de 1000000 dominios variantes con al menos un bucle modificado. El banco entonces se selecciona para la unión al antígeno específico. Después de la caracterización molecular para las propiedades deseadas, el dominio o minidominio seleccionado se clona en la inmunoglobulina original mediante técnicas de ingeniería genética de manera que reemplaza a la región de tipo salvaje. Como alternativa, sólo el ADN que codifica los bucles o que codifica los aminoácidos mutados puede intercambiarse para obtener una inmunoglobulina con el sitio de unión adicional para el antígeno específico.

45

La elección del sitio para el bucle estructural mutado específico de antígeno depende de la estructura de la inmunoglobulina original y del uso del sitio de unión adicional. Por ejemplo, si la molécula original es una inmunoglobulina completa que necesita tener insertado un sitio de unión al antígeno adicional sin que se altere la función efectora, los bucles que se van a modificar deben seleccionarse de dominios distantes de CH2 y CH3 que son las parejas de unión naturales para las moléculas efectoras Fc. Si la inmunoglobulina original es un Fab, es posible la modificación de los bucles en los dominios constantes de las cadenas ligeras o las cadenas pesadas o los respectivos dominios variables. Para generar un banco se pueden preparar bancos de moléculas originales mutantes que tengan mutaciones en uno o más bucles estructurales de uno o más dominios. La selección con moléculas originales mutadas completas puede tener algunas ventajas, puesto que la selección para la unión al antígeno con un bucle estructural modificado producirá las modificaciones estéricamente ventajosas si también se ensaya para las otras propiedades que debería mostrar la inmunoglobulina mutada.

El requisito del tamaño (es decir, el número de proteínas variantes) de un banco de proteínas de un dominio mutado o un minidominio o una molécula de fusión de un dominio depende de la tarea. En general, es necesario que un banco que vaya a generar un sitio de unión al antígeno *de novo* sea mayor que un banco que se utilice para modificar aún más un sitio de unión al antígeno modificado ya existente formado por un bucle estructural modificado (por ejemplo, para potenciar la afinidad o para cambiar la especificidad fina frente al antígeno).

La presente invención también se refiere a un banco de inmunoglobulinas o a un banco de ácidos nucleicos que comprende una pluralidad de inmunoglobulinas, por ejemplo, un dominio variable, un minidominio y/o al menos una región de bucle estructural contenida en un minidominio, o las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican. El banco contiene miembros con diferentes modificaciones, en el que la pluralidad se define por las modificaciones en dicha al menos una región de bucle estructural. El banco de ácidos nucleicos preferiblemente incluye al menos 10 miembros diferentes (que resultan en un intercambio de aminoácido) y más preferiblemente incluye al menos 100, más preferiblemente 1000 o 10000 miembros diferentes (por ejemplo, diseñado mediante estrategias de aleatorización o técnicas combinatorias). También se prefiere un número aún más diversificado de miembros individuales, tales como al menos 1000000 o al menos 10000000.

Otro aspecto de la invención es la combinación de dos dominios o minidominios diferentes seleccionados de al menos dos bancos según la invención para generar inmunoglobulinas multiespecíficas. Estas inmunoglobulinas específicas seleccionadas pueden combinarse entre sí y con otras moléculas, similares a bloques constituyentes, para diseñar la disposición óptima de los dominios o minidominios para obtener las propiedades deseadas.

Además, pueden introducirse una o más inmunoglobulinas modificadas según la invención en diversos o todos los diferentes sitios posibles de una proteína sin destruir la estructura de la proteína. Mediante esta técnica de "reordenamiento de dominios" se crean nuevos bancos que de nuevo se seleccionan para las propiedades deseadas.

El banco preferido contiene inmunoglobulinas según la invención, seleccionadas del grupo que consiste en dominios de una inmunoglobulina, minidominios o sus derivados.

Una realización preferida de la presente invención es una molécula de unión para un antígeno (molécula de unión al antígeno) que comprende al menos un dominio de inmunoglobulina y una región de bucle estructural que está modificada según la presente invención para que se una al antígeno, en la que dicha molécula de unión no comprende dominios variables de un anticuerpo. Puede comprender otras partes utilizables para actividades de anticuerpo (por ejemplo, tales como regiones efectoras naturales o modificadas (secuencias)); sin embargo, carece de la región de unión "natural" de los anticuerpos, es decir, los dominios variables en su posición natural. Estas moléculas de unión al antígeno según la presente invención tienen las ventajas descritas anteriormente para las presentes moléculas, pero sin la actividad de unión específica de los anticuerpos, aunque sin embargo con una actividad de unión específica recién introducida en la región de bucle estructural.

Preferiblemente, estas moléculas de unión al antígeno según la presente invención comprenden CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C y sus combinaciones; comprendiendo dichas combinaciones al menos dos, preferiblemente al menos cuatro, en especial al menos seis dominios constantes y al menos una región de bucle estructural modificada según la presente invención. Preferiblemente, estas regiones de bucles estructurales están conectadas a través de una región de bucle estructural modificada según la presente invención, o los bucles estructurales están presentes de modo natural entre estos dos dominios constantes. Una realización de estas moléculas de unión al antígeno consiste en la región Fc de un anticuerpo con al menos una modificación en un bucle estructural. Además, para las moléculas de unión al antígeno según la presente invención se prefiere que los nuevos sitios de unión al antígeno en los bucles estructurales se introduzcan por medio de tecnologías de aleatorización, es decir, intercambiando uno o más restos aminoácidos del bucle mediante técnicas de aleatorización o introduciendo inserciones generadas de modo aleatorio en dichos bucles estructurales. Como alternativa, se prefiere el uso de estrategias combinatorias.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a una inmunoglobulina modificada que tiene un sitio de unión al antígeno extraño a la inmunoglobulina no modificada e incorporado en uno o más bucles estructurales. El término

“extraño” significa que el sitio de unión al antígeno no está formado de modo natural por la región específica de la inmunoglobulina, y una pareja de unión extraña, pero no la pareja de unión natural de una inmunoglobulina, se une al sitio de unión al antígeno. Esto significa que no se considera que una pareja de unión, tal como un receptor de Fc o un efector del sistema inmunológico, se vaya a unir al sitio de unión al antígeno extraño a la inmunoglobulina no modificada.

Preferiblemente, el antígeno se selecciona del grupo que consiste en un antígeno de un patógeno, un antígeno asociado a tumores, una enzima, un sustrato, un autoantígeno, una molécula orgánica, o un alérgeno. Los antígenos más preferidos se seleccionan del grupo que consiste en antígenos víricos, antígenos bacterianos, o antígenos de patógenos de eucariotas o fagos. Los antígenos víricos preferidos incluyen antígenos de HAV, HBV, HCV, VIH I, VIH II, parvovirus, virus de la gripe, HSV, virus de la hepatitis, flavivirus, virus del Nilo Occidental, virus de Ébola, poxvirus, virus de la viruela, virus del sarampión, herpesvirus, adenovirus, virus del papiloma, virus del polio, parvovirus, rinovirus, virus de Coxsackie, virus de la poliomyelitis, echovirus, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue, virus de la encefalitis portado por garrapatas, virus de la fiebre amarilla, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de parainfluenza, virus de La Crosse, virus de Lassa, virus de la rabia, rotavirus; los antígenos bacterianos preferidos incluyen antígenos de *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Meningococcus*, *Borellia*, *Listeria*, *Neisseria*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Legionella*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Moraxella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Cardiobacterium*, *Francisella*, *Helicobacter*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Chlamydia*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Mycobacterium*, *Treponema*, *Bartonella*. Los antígenos de eucariotas patógenos preferidos incluyen antígenos de *Giardia*, *Toxoplasma*, *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Trichinella*, levaduras, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*.

Las inmunoglobulinas preferidas según la presente invención comprenden al menos dos sitios de unión al antígeno, uniéndose el primer sitio a un primer epítopo, y uniéndose el segundo sitio a un segundo epítopo.

Según una realización preferida, la presente inmunoglobulina comprende al menos dos regiones de bucles, uniéndose la primera región de bucle con un primer epítopo, y uniéndose la segunda región de bucle con un segundo epítopo. Al menos la primera región de bucle, al menos la segunda región de bucle, o ambas pueden contener un bucle estructural. Las inmunoglobulinas según la presente invención incluyen sus fragmentos conocidos en la técnica por ser funcionales, que contienen los elementos fundamentales según la presente invención: la región de bucle estructural modificada según la presente invención.

Preferiblemente, la inmunoglobulina según la presente invención está compuesta de al menos dos dominios de inmunoglobulina, o una parte de estos que comprenden un minidominio, y cada dominio contiene al menos un sitio de unión al antígeno.

También se prefiere una inmunoglobulina según la invención, que comprende al menos un dominio de la región constante y/o al menos un dominio de la región variable de la inmunoglobulina, o una parte de este que incluye un minidominio. Así, un dominio variable, que por ejemplo está modificado en la región C-terminal, o el dominio variable unido a una región CH1 modificada, por ejemplo un minidominio CH1 modificado, es una de las realizaciones preferidas.

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

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

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

El "porcentaje (%) de coincidencia de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de dominios de inmunoglobulinas identificadas en la presente se define como el porcentaje de restos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos aminoácidos en la secuencia del dominio de inmunoglobulina específica, después de alinear la secuencia y la introducción de huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de coincidencia de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la coincidencia de secuencia. El alineamiento para determinar el porcentaje de coincidencia de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro del conocimiento de la técnica, por ejemplo utilizando programas informáticos disponibles para el público, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Los valores del porcentaje de coincidencia de secuencia de aminoácidos pueden obtenerse como se describe a continuación utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 están ajustados a los valores por defecto. Los que no están ajustados a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se ajustan a los siguientes valores: distancia de solapamiento = 1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabras (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2 se determina el valor del porcentaje de coincidencia de secuencia de aminoácidos dividiendo (a) el número de restos aminoácidos idénticos apareados entre la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés que tiene una secuencia derivada del dominio de inmunoglobulina nativa, y la secuencia de aminoácidos de interés de comparación (es decir, la secuencia con la que se está comparando el dominio de inmunoglobulina de interés que puede ser el dominio de inmunoglobulina no modificado), según se determina por WU-BLAST-2, entre (b) el número total de restos aminoácidos de las partes no aleatorizadas del dominio de inmunoglobulina de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene al menos 80% de coincidencia de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de interés de comparación, y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del dominio de inmunoglobulina de interés.

En una realización preferida, la inmunoglobulina según la invención es un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo monocatenario biespecífico. También se prefiere que la inmunoglobulina comprenda un dominio biespecífico o una parte de este que incluya un minidominio.

La inmunoglobulina según la presente invención puede utilizarse para cualquier objetivo conocido en la técnica para las inmunoglobulinas pero también permite aplicaciones que dependen de la combinación de especificidades introducidas por la presente invención. Por consiguiente, las inmunoglobulinas según la presente invención se emplean preferiblemente para un uso terapéutico y profiláctico (por ejemplo, como una inmunoterapia activa o pasiva), para un uso preparativo y analítico, y para un uso de diagnóstico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit de parejas de unión que contiene:

(a) una inmunoglobulina modificada que tienen un sitio de unión al antígeno extraño a la inmunoglobulina incorporado en uno o más bucles estructurales, y

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

Esta molécula de unión de este kit según la presente invención puede utilizarse para identificar la especificidad de unión de la inmunoglobulina modificada según la presente invención. Utilizando la molécula de unión de este kit según la presente invención puede determinarse la potencia de las inmunoglobulinas modificadas según la presente invención.

La potencia, según se define en la presente, es la propiedad de unión de la molécula modificada a su antígeno. La unión puede determinarse de modo cuantitativo y/o cualitativo en términos de especificidad y/o afinidad y/o avidéz, según se emplea para objetivos de control de calidad.

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

Según la presente invención, una de las características clave de la presente invención es que la modificación de los dominios de inmunoglobulina se realiza en regiones que normalmente no están implicadas en la unión al antígeno, en otras palabras, en regiones que no son las CDR de un anticuerpo. Se observa que el plegamiento específico de los dominios de inmunoglobulinas permite la introducción de mutaciones aleatorias en regiones que son estructuralmente análogas a las CDR pero diferentes en la posición en la secuencia. Las regiones identificadas por

la presente invención son, igual que las CDR, regiones de bucles que conectan las cadenas beta del plegamiento de la inmunoglobulina.

De forma más específica, en la presente se describe que mediante la introducción de mutaciones aleatorias en los bucles que conectan las cadenas beta A-B y E-F de un dominio CH3 de IgG1 humana, se seleccionan dominios CH3 mutados que se unen específicamente al péptido del receptor similar a Toll-9 (TLR-9) o la lisozima de huevo de gallina, que son un péptido y una proteína, respectivamente, que normalmente no son reconocidos ni unidos por los dominios de CH3 de IgG1 humana. Las mutaciones introducidas por los inventores incluyen mutaciones en las que restos aminoácidos seleccionados en la secuencia de tipo salvaje se reemplazan por restos elegidos al azar, y también incluyen inserciones de restos aminoácidos adicionales en los bucles mencionados anteriormente.

Por analogía, los dominios de inmunoglobulinas de cualquier clase de inmunoglobulinas y de inmunoglobulinas de cualquier especie pueden someterse a este tipo de modificación. Además, no sólo pueden manipularse los bucles específicos a los que se dirige la presente invención, sino que cualquier bucle que conecte cadenas beta en dominios de inmunoglobulinas puede manipularse de la misma manera.

Los dominios de inmunoglobulinas modificados de cualquier organismo y de cualquier de inmunoglobulina pueden utilizarse según la presente invención como tales (como dominios individuales) o como parte de una molécula más grande. Por ejemplo, pueden ser parte de una inmunoglobulina intacta que, por consiguiente, tendría su región de unión al antígeno "normal" formada por las 6 CDR y la nueva región de unión al antígeno modificada. De forma similar, puede generarse una inmunoglobulina multiespecífica, por ejemplo, biespecífica. Los dominios de inmunoglobulinas modificados también pueden formar parte de cualquier proteína de fusión. El uso de estos dominios de inmunoglobulinas modificados pertenece al campo general del uso de las inmunoglobulinas.

Los dominios de las siguientes inmunoglobulinas se entienden como dominios de inmunoglobulinas en la presente:

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

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

1. Dominios de inmunoglobulina individuales aleatorizados en un lado, es decir, en los bucles que conectan las cadenas beta B-C, D-E- o F-G (el "extremo", con la excepción de los dominios variables que son cubiertos por muchas patentes) o las cadenas beta A-B, C-D, (C-C' y C"-D en el caso de los dominios variables) o E-F (la "parte baja"). Pueden aleatorizarse bucles individuales o cualquier combinación de bucles. Los restos pueden cambiarse, delecionarse, o pueden insertarse restos adicionales.

2. Dominios de inmunoglobulina individuales aleatorizados en ambos lados, el extremo y la parte baja.

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

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

b) Fv monocatenarios aleatorizados en la "parte baja", es decir, en el lado opuesto a las CDR,

c) fragmentos Fab aleatorizados en la "parte baja", es decir, en el extremo C-terminal del dominio CH1 y del dominio CL,

d) fragmentos Fc (es decir, proteínas que consisten en CH2-CH3) aleatorizados en uno o ambos lados,

e) inmunoglobulinas completas aleatorizadas en la parte baja de Fc,

f) otros dominios adecuados.

La principal ventaja de los dominios individuales es que son muy similares a todos los argumentos que se emplean para estimular a moléculas de VH de camello ("nanocuerpos", véase www.ablynx.com). Los dominios de inmunoglobulina aleatorizados son proteínas muy pequeñas (peso molecular de aproximadamente 12-15 kDa, dependiendo del número de restos aminoácidos insertados) y por tanto tendrán las siguientes ventajas comparados con los anticuerpos convencionales o con fragmentos de anticuerpos, tales como scFv y Fab: reconocen epitopos poco habituales o escondidos, se unen a cavidades o sitios activos de las dianas de proteínas, son fáciles de producir, y muchas otras. En el caso de un dominio de inmunoglobulina que esté aleatorizado en ambos lados puede generarse una molécula bivalente o biespecífica. Las principales ventajas de los dominios individuales como parte de proteínas de fusión es que se pueden modificar otras propiedades de unión sobre cualquier otra proteína.

Se contempla que puede utilizarse cualquier sistema de expresión para preparar las proteínas. Una analogía con los dominios individuales descritos en la presente puede encontrarse en los anticuerpos de camello, que sólo tienen una VH pero no tienen VL. En estas proteínas, sólo 3 CDR (en lugar de las 6 en los anticuerpos "normales") son

responsables de la unión al antígeno.

Las siguientes referencias de patentes se incorporan en la presente como referencia como si se mostraran en su totalidad en la presente:

- 5 - documento US 6.294.654: Una molécula de inmunoglobulina modificada que incorpora un antígeno en una región de bucle que no es un bucle de CDR.
- documento US 5.844.094: Polipéptido de unión a la diana.
- documento US 5.395.750: Métodos para producir proteínas que se unen a antígenos predeterminados.
- documento 2004/0071690: Reactivos polivalentes y poliespecíficos de alta avidéz.
- documento 2004/0018508: Sustitutos de anticuerpos y métodos para su preparación y su uso.
- 10 - documento 2003/0157091: Proteínas multifuncionales.
- documento 2003/0148372: Método para seleccionar bancos de presentación de fagos con diferentes ligandos.
- documento 2002/0103345: Proteínas de unión al antígeno de tipo inmunoglobulina biespecífica y método de producción.
- documento 2004/0097711: Proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.
- 15 - documento 2004/0082508: Proteínas segregadas.
- documento 2004/0063924: Proteínas segregadas.
- documento 2004/0043424: Proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas.
- documento US 5.892.019: Producción de una inmunoglobulina codificada por un solo gen.
- documento US 5.844.094: Polipéptido de unión a la diana.
- 20 La presente invención se ilustra más a fondo en las siguientes figuras y ejemplos sin estar restringidos a ellos.
- La figura 1a muestra la estructura de una IgG1 intacta. Los dominios se indican con flechas.
- La figura 1b ilustra la organización estructural de los monómeros del principal isotipo de inmunoglobulina humana. Los enlaces disulfuro se muestran como líneas, y los grupos carbohidrato N-enlazados se muestran como círculos.
- 25 La figura 2 muestra el plegamiento de una inmunoglobulina para un dominio constante (izquierd) y un dominio variable (derecha) de una inmunoglobulina. Las cadenas beta se indican mediante flechas.
- La figura 3 muestra un modelo molecular del dominio CH3 modificado con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible al disolvente. La superficie está rodeada por un círculo.
- La figura 4 muestra una presentación esquemática de las PCR utilizadas para la producción de los fragmentos utilizados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado. Los cebadores de PCR se indican mediante flechas con su respectiva orientación 5'-3', y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas de los sitios de restricción introducidos que se emplean para el ensamblaje del gen mutado. Los siguientes sitios de restricción están contenidos en los cebadores para los acoplamientos de los fragmentos de PCR: CH3LNCO: NcoI; CH3LSAC y CH3CSAC: SacI; CH3CHIN y CH3RHIN: HindIII; CH3RNOT: NotI.
- 30 La figura 5 muestra algunos ejemplos de cómo pueden utilizarse los dominios de inmunoglobulina de la presente solicitud. Las regiones aleatorizadas se indican con una estrella. Las especificidades de las regiones aleatorizadas en una molécula pueden ser idénticas o diferentes.
- La figura 6 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 modificado biespecífico. Los nombres de los cebadores aparecen en recuadros y las flechas indican la dirección en que se alargan los cebadores. Los recuadros con líneas oblicuas indican las posiciones relativas de las regiones que estan aleatorizadas en esta construcción, los recuadros con líneas verticales indican las posiciones relativas de las regiones que han sido introducidas para la generación del clon C24, y se indican los sitios de restricción utilizados para el procedimiento de clonación.
- 40 La figura 7 muestra una presentación esquemática del diseño del dominio CH3 modificado biespecífico. La secuencia de nucleótidos y su traducción se muestra en el diseño básico del dominio CH3 modificado biespecífico.

Las secuencias en rojo indican regiones aleatorizadas para generar la construcción biespecífica, mientras que los recuadros verdes indican las regiones en las que se aleatorizó la secuencia para generar el clon C24.

La figura 8 muestra el listado de secuencias de las secuencias descritas en la presente.

Descripción de los ejemplos específicos:

5 Ejemplo 1: Construcción del banco de CH3 y presentación en la superficie de fagos

Se empleó la estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1, que está publicado en la base de datos Brookhaven como la entrada 1OQO.pdb, para ayudar al diseño del dominio CH3 mutado.

La secuencia que se utilizó como base para la construcción del banco de CH3 se indica en SEQ ID NO:1. En esta secuencia, el primer aminoácido se corresponde con la prolina 343 de la cadena A de la entrada de la base de datos Brookhaven 1oqo.pdb. El último resto contenido en 1oqo.pdb es la serina 102 de SEQ ID NO:1. Después del análisis detallado de la estructura de 1oqo.pdb y mediante la inspección visual de los restos que forman los bucles que conectan las cadenas beta, se decidió aleatorizar los restos 17, 18 y 19, que son parte del bucle que conecta las cadenas beta A-B, así como 71, 72, 73, 76 y 77, que son parte del bucle que conecta la cadena beta E-F de SEQ ID NO:1. Un modelo molecular del dominio CH3 modificado, con la parte aleatorizada indicada por una superficie accesible al disolvente, se muestra en la figura 3. El gen modificado se produjo mediante una serie de reacciones de PCR, seguido del acoplamiento de los productos de la PCR resultantes. Para facilitar el acoplamiento, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifican SEQ ID NO:1 se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silenciosas). Para la inserción en el vector de clonación pHEN1 (Nucleic Acids Res., 1991, 11 de agosto, 19(15):4133-4137, Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains, Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P., Winter, G.) en marco con la señal de secreción pelB, se unieron restos nucleótidos adicionales que codifican Met-Ala en el extremo 5' de la secuencia para crear un sitio de restricción NcoI. Para los restos aleatorizados, se eligió el codón NNS (código IUPAC, en la que S significa C o G) que codifica la totalidad de los 20 aminoácidos naturales pero evita 2 de 3 codones de fin. La secuencia modificada se indica como una secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO:2, y como una secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO:3. La letra X en SEQ ID NO:3 indica los restos aminoácidos aleatorizados. Las secuencias de los cebadores de PCR utilizados para el ensamblaje del dominio CH3 mutado se indica en SEQ ID NO:4 a 9. La figura 4 muestra una presentación esquemática de los fragmentos de PCR generados para el ensamblaje del gen mutado, y los cebadores utilizados para ello.

Se empleó el ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer, M., Kohl, J., Rüker, F., Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1-gp41, Nucleic Acids Res., 1990, 25 de agosto, 18(16):4927) como molde para las reacciones de PCR. Los tres productos de la PCR se digirieron con SacI y/o HindIII, respectivamente, y se acoplaron entre sí. El producto del acoplamiento después se digirió con NcoI y NotI, y se acopló en el vector de fágido de presentación sobre la superficie pHEN1, que se había digerido previamente con NcoI y NotI. Se controló una serie de clones seleccionados mediante un análisis de restricción y mediante secuenciación de ADN, y se descubrió que contenían el inserto según se planeó, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas correctamente. Para las siguientes etapas de la preparación de fagos se siguieron protocolos convencionales. Brevemente, la mezcla de acoplamiento se transformó en células TG1 de *E. coli* mediante electroporación. Después las partículas de fagos se rescataron de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Las partículas de fagos entonces se precipitaron del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disolvieron en agua y se utilizaron para la selección mediante inmuoadsorción o, como alternativa, se conservaron a -80 °C.

Ejemplo 2: Construcción del banco de CH3+3

Este banco se construyó y se clonó de la misma manera que el banco de CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se indica en SEQ ID NO:10, la correspondiente secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO:11, y los cebadores utilizados para la construcción fueron SEQ ID NO:4-7, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:12.

Ejemplo 3: Construcción del banco de CH3+5

Este banco se construyó y se clonó de la misma manera que el banco de CH3. La secuencia de aminoácidos de la construcción se indica en SEQ ID NO:13, la correspondiente secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO:14, y los cebadores utilizados para la construcción fueron SEQ ID NO:4-7, SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:15.

Ejemplo 4: Inmuoadsorción del banco de fagos-CH3 sobre el péptido de TLR-9

Se realizaron tres rondas de inmuoadsorción según protocolos convencionales. Brevemente, se aplicó el siguiente método. Se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con un péptido sintético que representa parte de la

secuencia del receptor de tipo Toll-9 (TLR-9). Se añadieron 200 µl de la siguiente disolución por pocillo: tampón Na-carbonato 0,1 M, pH 9,6, con las siguientes concentraciones de péptido disuelto:

1ª ronda de inmunoadsorción: péptido de TLR-9 1 mg/ml

2ª ronda de inmunoadsorción: péptido de TLR-9 500 µg/ml

5 3ª ronda de inmunoadsorción: péptido de TLR-9 100 µg/ml

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

10 Entonces se dejó que el banco de fagos de presentación sobre la superficie reaccionase con el péptido unido añadiendo 100 µl de una suspensión de fagos y 100 µl de leche en polvo al 4% (M-PBS), seguido de una incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fagos sin unir retiraron mediante un lavado como sigue. Después de la 1ª ronda de inmunoadsorción: 10 x 300 µl de T-PBS, 5 x 300 µl de PBS; después de la 2ª ronda de inmunoadsorción: 15 x 300 µl de T-PBS, 10 x 300 µl de PBS; después de la 3ª ronda de inmunoadsorción: 20 x 300 µl de T-PBS, 20 x 300 µl de PBS.

15 La elución de las partículas de fagos unidas se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2, y una incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después la suspensión de fagos se neutralizó mediante la adición de 60 µl de Tris-Base 2 M, seguido de una infección en células TG1 de *E. coli* mezclando 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido y una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Por último, las bacterias infectadas se cultivaron en placa en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron a 30 °C durante la noche.

Tabla 1: Resultados de la inmunoadsorción del banco de fagos-CH3 sobre el péptido de TLR-9 (titulaciones de los fagos)

Ronda de inmunoadsorción	Concentración de TLR-9 en la inmunoadsorción	Entrada (fagos/ml)	Salida (fagos/ml)
1ª	1 mg/ml	6×10^{18}	2×10^{10}
2ª	0,5 mg/ml	4×10^{18}	2×10^{10}
3ª	0,1 mg/ml	4×10^{22}	6×10^{10}

25 **Ejemplo 5: Clonación de clones seleccionados de mutantes de CH3 seleccionados contra TLR-9 para la expresión soluble**

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

Ejemplo 6: ELISA de mutantes de CH3 seleccionados contra TLR-9

Se ensayaron clones seleccionados para la unión específica al péptido de TLR-9 mediante un ELISA.

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb), 100 µl por pocillo, 20 µg de péptido de TLR-9/ml de tampón Na-carbonato 0,1 M, pH 9,6, 1 h a 37 °C

40 Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

- 5 1º anticuerpo: anti-His₄ (Qiagen), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a temperatura ambiente, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

2º anticuerpo: anti-ratón de cabra conjugado con HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a temperatura ambiente, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Detención: 100 µl de H₂SO₄ 3 M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

- 15 Los clones que tienen una alta señal para este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo según se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (tal como se describió anteriormente) para la confirmación.

Tabla 2: Resultados del ELISA de confirmación

	con antígeno	sin antígeno
Clon	A _{492/620} , 4 lecturas	A _{492/620} , 1 lectura
A67	0,0435	0,019
B54	0,0937	0,051
C67	0,0295	0,013

Fondo (sólo antígeno) (12 lecturas paralelas): 0,0115

Ejemplo 7: Inmunoadsorción del banco de fagos-CH3 y -CH3+5 sobre la lisozima de huevo de gallina

- 20 Se realizaron tres rondas de inmunoadsorción. Se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con lisozima de huevo de gallina añadiendo 200 µl de la siguiente disolución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

1ª ronda de inmunoadsorción: HEL 2 mg/ml

2ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

- 25 3ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

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

- 30 Entonces se dejó que el banco de fagos de presentación sobre la superficie reaccionase con la lisozima de huevo de gallina unida añadiendo 100 µl de una suspensión de fagos y 100 µl de leche en polvo al 4% (M-PBS), seguido de una incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fagos sin unir retiraron mediante un lavado como sigue.

1ª ronda de inmunoadsorción: 10 x 300 µl de T-PBS, 5 x 300 µl de PBS

2ª ronda de inmunoadsorción: 15 x 300 µl de T-PBS, 10 x 300 µl de PBS

3ª ronda de inmunoadsorción: 20 x 300 µl de T-PBS, 20 x 300 µl de PBS

- 5 La elución de las partículas de fagos unidas se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2, y una incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después la suspensión de fagos se neutralizó mediante la adición de 60 µl de Tris-Base 2 M, seguido de una infección en células TG1 de *E. coli* mezclando 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido y una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Por último, las bacterias infectadas se cultivaron en placa en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron a 30 °C durante la noche.

Tabla 3: Resultados de la inmunoadsorción del banco de fagos-CH3 sobre la lisozima de huevo de gallina (titulaciones de los fagos)

Ronda de inmunoadsorción	Concentración de HEL en la inmunoadsorción	Entrada (fagos/ml)	Salida (fagos/ml)
1 ^a	2 mg/ml		$4,7 \times 10^{10}$
2 ^a	1 mg/ml	$1,29 \times 10^{22}$	$8,0 \times 10^9$
3 ^a	1 mg/ml	$5,71 \times 10^{20}$	$4,8 \times 10^{10}$

- 10 Tabla 4: Resultados de la inmunoadsorción del banco de fagos-CH3+5 sobre la lisozima de huevo de gallina (HEL) (titulaciones de los fagos)

Ronda de inmunoadsorción	Concentración de HEL en la inmunoadsorción	Entrada (fagos/ml)	Salida (fagos/ml)
1 ^a	2 mg/ml	$8,3 \times 10^{16}$	$2,9 \times 10^9$
2 ^a	1 mg/ml	$2,1 \times 10^{19}$	$2,6 \times 10^9$
3 ^a	1 mg/ml	$5,4 \times 10^{19}$	$1,2 \times 10^{10}$

Ejemplo 8: Clonación de clones seleccionados del ejemplo 7 para la expresión soluble

- 15 La clonación de los clones seleccionados para la expresión soluble se realizó como se describió anteriormente para los mutantes de CH3 seleccionados contra TLR-9.

Ejemplo 9: Expresión soluble de clones seleccionados del ejemplo 7

La expresión soluble de clones seleccionados se realizó como se describió anteriormente para los mutantes de CH3 seleccionados contra TLR-9. Se ensayaron extractos periplásmicos en un ELISA preliminar (véase el ejemplo 10 para el protocolo).

- 20 Los clones que produjeron una señal alta en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo según se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (según se describió en el ejemplo 10) para la confirmación.

Ejemplo 10: ELISA de mutantes de CH3 seleccionados contra lisozima de huevo de gallina

- 25 Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb), 100 µl por pocillo, 100 µg de lisozima de huevo de gallina/ml de PBS, 1 h a 37 °C

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

2º anticuerpo: anti-ratón de cabra conjugado con HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a temperatura ambiente, 100 µl por pocillo

5 Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Detención: 100 ml de H₂SO₄ 3 M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

10 Tabla 5: Resultados del ELISA de confirmación de mutantes de C_H3 seleccionados contra la lisozima de huevo de gallina

	con antígeno	sin antígeno
Clon	A _{492/620} , 4 lecturas	A _{492/620} , 1 lectura
B12	0,396	0,012
D10	0,415	0,026
D46	0,398	0,011

Fondo (sólo antígeno) (12 lecturas paralelas): 0,1763

Tabla 6: Resultados del ELISA de confirmación con diluciones de antígenos de mutantes de C_H3 seleccionados contra la lisozima de huevo de gallina

c (µg/ml)	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,55	0,78	0,39
Clon										
B12	0,707	0,532	0,432	0,297	0,192	0,150	0,148	0,049	0,034	0,015
D46	0,713	0,561	0,342	0,220	0,133	0,088	0,047	0,032	0,021	0,010
D10	0,715	0,685	0,571	0,368	0,231	0,175	0,171	0,068	0,047	0,026
- (nc)	0,449	0,360	0,165	0,072	0,038	0,023	0,017	0,013	0,009	0,007

nc: no se añade extracto periplásmico

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

Tabla 7: Resultados del ELISA de confirmación de mutantes de C_H3+5 seleccionados contra la lisozima de huevo de gallina

	con antígeno	sin antígeno
Clon	A _{492/620} , 4 lecturas	A _{492/620} , 1 lectura
A13	0,197	0,016
A66	0,461	0,019
B18	0,533 (5 lecturas)	no se realizó
B20	0,184	0,016
B68	0,535	0,019

B40	0,706	0,051
C24	0,352	0,072
D22	0,147	0,019
C22	0,439	0,017
D37	0,360	0,026
D40	0,559	0,034
D56	0,369	0,019

Fondo (sólo antígeno) (12 lecturas paralelas): 0,1334

Nota: la lisozima de huevo de gallina reacciona con el anticuerpo anti-his₄, y por tanto se observa un fondo relativamente alto.

Ejemplo 11: Banco de CL

5 Se emplea una inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento Fab (se utiliza la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: banco de datos de proteínas RSCB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), entrada 1DFB.PDB (He, X.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 1 de agosto, 89(15):7154-7158), y un análisis con ordenador (por ejemplo, se usa Protein Explorer para este fin (<http://molvis.sdsc.edu/protexpl/frntdoor.htm>)) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína permite identificar restos localizados en regiones de bucles que
10 conectan las cadenas beta del andamiaje del dominio CL. Estos restos comprenden los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 27 a 35, los aminoácidos 42 a 78, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 108 a 117, y los aminoácidos 123 a 126 (numeración según el sistema de numeración IMGT (Lefranc, M.P., *et al.*, Nucleic Acids Res., 2005, 1 de enero, 33 (ejemplar de la base de datos):D593-7; Lefranc, M.P., *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 2005, 29(3):185-203)).

15 De forma más específica, los restos 11, 12, 14-18, y 92-95 se aleatorizan dentro del dominio CL humano (SEQ ID NO:48). La aleatorización se consigue mediante la amplificación mediante PCR de las secuencias codificadoras con cebadores de PCR en los que las posiciones de los codones pertinentes son codificadas por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que potencialmente codifica todos los 20 aminoácidos mientras que evita 2 de 3 codones de fin. La inserción del banco se amplifica mediante dos reacciones de PCR separadas, y los dos fragmentos de PCR
20 se acoplan a través de un sitio de restricción HpyCH4IV que es introducido como una mutación silenciosa por los cebadores de la PCR. Los cebadores también proporcionan los sitios de endonucleasas de restricción NcoI y NotI, respectivamente, para clonar en el vector de presentación de fagos pHEN (Hoogenboom, H.R., *et al.*, Nucleic Acids Res., 1991, 11 de agosto, 19(15):4133-4137). La cisteína C-terminal del dominio CL no se incluye para la presentación de fagos, pero puede añadirse más tarde cuando se emplea un clon de CL modificado, por ejemplo,
25 para la construcción de un fragmento Fab.

Como molde para la amplificación de PCR se emplea un plásmido, tal como pRcCMV-3D6LC (Rüker, F., *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1991, 27 de diciembre, 646:212-216), que contiene como un inserto la cadena ligera completa del anticuerpo monoclonal humano.

30 Para los bancos de CL+3 (SEQ ID NO:50, 51) y CL+5 (SEQ ID NO:52, 53), que contienen residuos adicionales insertados entre la posición 92 y 95 del dominio CL, se emplean los cebadores CLRHPY3 y CLRHPY5, respectivamente, en lugar del cebador CLRHPY.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del producto final de las PCR y los acoplamientos, clonado en el sitio NcoI de pHEN1, que conduce a la unión de una secuencia conductora pelB hasta el N-terminal de la construcción, se muestra a continuación (SEQ ID NO:48, 49):

35 +3 M K Y L L P T A A A G L L L L A A

1 ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC

NcoI

+3 Q P A M A V A A P S V F I F P P
51 CCAGCCGGCC ATGGCCGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC TTCCCGCCAT

+3 S Q A S V V C L L N
101 CTNNSNNSCA GNNSNNSNNS NNSNNSGCCT CTGTTGTGTG CCTGCTGAAT

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

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

HpyCH4IV

+3 S T Y S L S S T L T L Y E
251 GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCCTGACGT TGNNNSNNSNN SNNSTACGAG

+3 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
301 AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC TGAGCTCGCC

NotI

+3 V T K S F N R G E A A A
351 CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGGC GGCCGCA

Lista de cebadores para el banco de CL:

cllnco: 5'-cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcattctcc
cgccatctnn snnscagnns nnsnnsnnsn nsgcctctgt tgtgtgc-3' (SEQ ID
No. 56)

cllhpy: 5'-tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc-3' (SEQ ID No. 57)

clrhpy: 5'-tcagaacgtt gnnsnnsnns nnstacgaga aacacaaagt c-3'
(SEQ ID No. 58)

clrhpy3: 5'-tcagaacgtt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nstacgagaa aca-
caaagtc-3' (SEQ ID No. 59)

clrhpy5: 5'-tcagaacggtt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsta cga-
gaaacac aaagtc-3' (SEQ ID No. 60)

clrnot: 5'-catcgcgggcc gcctctcccc tgttgaagct c-3' (SEQ ID No.
61)

Una serie de clones del banco seleccionados (dominios CL mutados clonados en el vector de fágido pHEN1) se controlan mediante un análisis de restricción y mediante secuenciación de ADN para determinar si contienen el inserto según se ha planeado, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas correctamente. Para las siguientes etapas de la preparación de fagos se siguen protocolos convencionales. Brevemente, la mezcla de acoplamiento se transforma en células TG1 de *E. coli* mediante electroporación. Posteriormente, las partículas de los fagos se rescatan de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Entonces se precipitan las partículas de fagos del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se emplean para la selección mediante inmunoadsorción o, como alternativa, pueden conservarse a -80 °C.

10 **Ejemplo 12: Banco de CH1**

Se emplea una inspección visual de la estructura cristalina de un fragmento Fab (se utiliza la estructura del Fab del anticuerpo monoclonal humano 3D6: entrada del banco de datos de proteínas RSCB 1DFB.PDB), y un análisis con ordenador (se usa Protein Explorer para este fin) de la estructura secundaria y terciaria de esta proteína permite identificar restos localizados en regiones de bucles que conectan las cadenas beta del andamiaje del dominio CH1. Estos restos comprende los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103, y los aminoácidos 106 a 117 (numeración según el sistema de numeración IMGT).

De forma más específica, los restos 12-19 y 93-100 se aleatorizan dentro del dominio CH1 humano (SEQ ID NO:54, 55). La aleatorización se consigue mediante la amplificación mediante PCR de las secuencias codificadoras con cebadores de PCR en los que las posiciones de los codones pertinentes son codificadas por la secuencia de nucleótidos 5'-NNS-3', que potencialmente codifica todos los 20 aminoácidos mientras que evita 2 de 3 codones de fin. El inserto del banco se amplifica mediante dos reacciones de PCR separadas, y los dos fragmentos de PCR se acoplan a través de un sitio de restricción BstEII que aparece de modo natural en el dominio CH1. Los cebadores también proporcionan los sitios de endonucleasas de restricción NcoI y NotI, respectivamente, para clonar en el vector de presentación de fagos pHEN. La cisteína C-terminal del dominio CH1 no se incluye para la presentación de fagos, pero puede añadirse más tarde cuando se emplea un clon de CH1 modificado, por ejemplo, para la construcción de un fragmento Fab.

Como molde para la amplificación de PCR se emplea un plásmido, tal como pRcCMV-3D6HC, que contiene como un inserto la cadena pesada completa del anticuerpo monoclonal humano.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del producto final de las PCR y los acoplamientos, clonado en el sitio NcoI de pHEN1, que conduce a la unión de una secuencia conductora pelB hasta el N-terminal de la construcción, se muestra a continuación (SEQ ID NO:54, 55):

ES 2 384 039 T3

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

NcoI

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

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

+3 V K D Y F P E P V T V S W N S G A
151 GTCAAGGACT ACTTCCCCGA ACCGGTGACG GTGTCGTGGA ACTCAGGCGC

+3 L T S G V H T F P A V L Q S S G
201 CCTGACCAGC GGC GTGCACA CCTTCCCCGGC TGTCTACAG TCCTCAGGAC

BstEII

+3 L Y S L S S V V T V P
251 TCTACTCCCT CAGCAGCGTG GTGACCGTGC CCNNSNNSNN SNNSNNSNNS

+3 T Y I C N V N H K P S N T K V D
301 NNSACCTACA TCTGCAACGT GAATCACAAG CCCAGCAACA CCAAGGTGGA

NotI

+3 K K V E P K S A A A
351 CAAGAAAGTT GAGCCCAAAT CTGCGGCCGC A

Listado de cebadores para el banco de CH1:

CH1LNCO: 5'-acgtccatgg cgcctccac caagggccca tcggtcttcc
ccctggcacc ctcctccnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn sgccctgggc
tgccctgggc-3' (SEQ ID No. 62)

CH1LBST: 5'-ggcacggtca ccacgtgct gag-3' (SEQ ID No. 63)

CH1RBST: 5'-agcgtggtga ccgtgccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa
cctacatctg caacgtgaat c-3' (SEQ ID No. 64)

CH1RNOT: 5'-catagcggcc gcagatttgg gctcaacttt cttgtc-3' (SEQ
ID No. 65)

Un número de clones del banco seleccionados (dominios CH1 mutados clonados en el vector de fágido pHEN1) se controlan mediante un análisis de restricción y mediante secuenciación de ADN para determinar si contienen el inserto según se ha planeado, incluyendo las secuencias aleatorizadas insertadas correctamente. Para las siguientes etapas de la preparación de fagos se siguen protocolos convencionales. Brevemente, la mezcla de acoplamiento se transforma en células TG1 de *E. coli* mediante electroporación. Posteriormente, las partículas de los fagos se rescatan de las células TG1 de *E. coli* con el fago auxiliar M13-KO7. Entonces se precipitan las partículas de fagos del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en 2 etapas, se disuelven en agua y se emplean para la selección mediante inmunoadsorción o, como alternativa, pueden conservarse a -80 °C.

Ejemplo 13: Inmunoadsorción del banco de fagos-CH1 sobre la lisozima de huevo de gallina (HEL)

Se realizaron tres rondas de inmunoadsorción con el banco de fagos-CH1 (véase el ejemplo 12). Se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con lisozima de huevo de gallina añadiendo 200 µl de la siguiente disolución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

1ª ronda de inmunoadsorción: HEL 2 mg/ml

2ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

3ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

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

Entonces se dejó que el banco de fagos de presentación sobre la superficie reaccionase con la lisozima de huevo de gallina unida añadiendo 100 µl de una suspensión de fagos y 100 µl de leche en polvo al 4% (M-PBS), seguido de una incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fagos sin unir retiraron mediante un lavado como sigue.

1ª ronda de inmunoadsorción: 10 x 300 µl de T-PBS, 5 x 300 µl de PBS

2ª ronda de inmunoadsorción: 15 x 300 µl de T-PBS, 10 x 300 µl de PBS

3ª ronda de inmunoadsorción: 20 x 300 µl de T-PBS, 20 x 300 µl de PBS

La elución de las partículas de fagos unidas se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2, y una incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después la suspensión de fagos se neutralizó mediante la adición de 60 µl de Tris-Base 2 M, seguido de una infección en células TG1 de *E. coli* mezclando 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido y una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Por último, las bacterias infectadas se cultivaron en placa en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron a 30 °C durante la noche.

Clonación de clones seleccionados de mutantes de CH1 seleccionados contra la lisozima para la expresión soluble

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

Los clones que producen una alta señal en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo según se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (tal como se describe a continuación) para la confirmación.

ELISA de mutantes de CH1 seleccionados contra la lisozima de huevo de gallina

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb), 100 µl por pocillo, 100 µg de lisozima de huevo de gallina/ml de PBS, 1 h a 37 °C

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

- 10 2º anticuerpo: anti-ratón de cabra conjugado con HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a temperatura ambiente, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Detención: 100 ml de H₂SO₄ 3 M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

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

Ejemplo 14: Inmunoadsorción del banco de fagos-CL sobre la lisozima de huevo de gallina (HEL)

Se realizaron tres rondas de inmunoadsorción con el banco de fagos-CL (véase el ejemplo 11). Se revistieron placas Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) con lisozima de huevo de gallina añadiendo 200 µl de la siguiente disolución por pocillo: PBS, con las siguientes concentraciones de lisozima de huevo de gallina disuelta:

- 20 1ª ronda de inmunoadsorción: HEL 2 mg/ml

2ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

3ª ronda de inmunoadsorción: HEL 1 mg/ml

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

- 25 Entonces se dejó que el banco de fagos de presentación sobre la superficie reaccionase con la lisozima de huevo de gallina unida añadiendo 100 µl de una suspensión de fagos y 100 µl de leche en polvo al 4% (M-PBS), seguido de una incubación durante 45 minutos con agitación y durante 90 minutos sin agitación a temperatura ambiente.

Las partículas de fagos sin unir retiraron mediante un lavado como sigue.

1ª ronda de inmunoadsorción: 10 x 300 µl de T-PBS, 5 x 300 µl de PBS

- 30 2ª ronda de inmunoadsorción: 15 x 300 µl de T-PBS, 10 x 300 µl de PBS

3ª ronda de inmunoadsorción: 20 x 300 µl de T-PBS, 20 x 300 µl de PBS

La elución de las partículas de fagos unidas se realizó añadiendo 200 µl por pocillo de glicina 0,1 M, pH 2,2, y una incubación con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después la suspensión de fagos se neutralizó mediante la adición de 60 µl de Tris-Base 2 M, seguido de una infección en células TG1 de *E. coli* mezclando 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial con 0,5 ml de fago eluido y una incubación durante 30 minutos a 37 °C. Por último, las bacterias infectadas se cultivaron en placa en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina 100 µg/ml, y se incubaron a 30 °C durante la noche.

- 35

Clonación de clones seleccionados de mutantes de CL seleccionados contra la lisozima para la expresión soluble

- 40 Se aísla con un midi-prep ADN fagmídico del fago seleccionado a través de 3 rondas de inmunoadsorción. El ADN que codifica los dominios CL mutados se amplifica de modo discontinuo mediante PCR y se clona con *NcoI*-*NotI* en el vector pNOTBAD/Myc-His, que es el vector de expresión de *E. coli* pBAD/Myc-His (Invitrogen) con un sitio de

restricción NotI insertado para facilitar la clonación. Las construcciones acopladas se transforman en células LMG194 de *E. coli* (Invitrogen) con electroporación, y se cultivaron a 30 °C en medio TYE con glucosa al 1% y ampicilina durante la noche. Los clones seleccionados se inocularon en 200 µl de medio 2xYT con ampicilina, se cultivaron durante la noche a 30 °C, y se indujeron mediante la adición de L-arabinosa hasta una concentración final del 0,1%. Después de la expresión a 16 °C durante la noche, las células se recolectaron mediante centrifugación y se trataron con 100 µl de tampón Na-borato, pH 8,0, a 4 °C durante la noche para la preparación de extractos periplásmicos. Se emplearon 50 µl de los extractos periplásmicos en un ELISA.

Los clones que producen una alta señal en este primer ELISA preliminar se cultivaron en un volumen de 20 ml en las mismas condiciones que se describieron anteriormente. Sus extractos periplásmicos se aislaron en 1/20 del volumen de cultivo según se describió anteriormente y se ensayaron con ELISA (tal como se describe a continuación) para la confirmación.

ELISA de mutantes de CL seleccionados contra la lisozima de huevo de gallina

Revestimiento: Placa de microtitulación (NUNC, Maxisorb), 100 µl por pocillo, 100 µg de lisozima de huevo de gallina/ml de PBS, 1 h a 37 °C

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

2º anticuerpo: anti-ratón de cabra conjugado con HRP (SIGMA), 1:1000 en BSA-PBS al 1%, 90 min a temperatura ambiente, 100 µl por pocillo

Lavado: 3 x 200 µl de PBS

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

Detención: 100 µl de H₂SO₄ 3 M

Lectura de absorbancia: 492/620 nm

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

Ejemplo 15: Construcción de un dominio de inmunoglobulina que está aleatorizado en ambos extremos (dominio C_H3 modificado biespecífico)

Este ejemplo describe un dominio de inmunoglobulina modificado con dos especificidades de unión.

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

· Se utilizó un dominio C_H3 modificado, el clon C24 (véase el ejemplo 10), derivado del banco C_H3+5 que se une específicamente con la lisozima, como punto de partida.

· Se identificaron los restos que se van a aleatorizar en este dominio CH3 modificado que están conectando las cadenas β del plegamiento de la inmunoglobulina, y que se encuentran en el lado opuesto del dominio comparado con los restos que fueron mutados cuando se generó el clon C24.

· Se diseñaron cebadores de PCR que permitieron la aleatorización de estos restos y la síntesis de este dominio de inmunoglobulina modificado en un procedimiento similar al descrito anteriormente para los bancos de C_H3, C_H3+3 y C_H3+5.

Se acoplaron cuatro productos de PCR que contenían posiciones aleatorizadas y se amplificaron insertos de longitud completa mediante PCR. Después se clonaron en pHEN-1 mediante sitios NcoI-NotI y se transformaron en células TG-1 de *E. coli* para construir un banco de aproximadamente 10⁸ colonias. Se secuenciaron 20 colonias

elegidas al azar y se descubrió que las posiciones aleatorizadas estaban mutadas independientemente. Además no se observó ninguna secuencia “de tipo salvaje” (C24). Se generó el banco de fagos siguiendo protocolos convencionales, y se logró una titulación de fagos de $6,32 \times 10^{10}$ TU/ml.

Para ensayar la biespecificidad, se eligió la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) como segundo antígeno, mientras que se espera que la construcción mantenga su especificidad originariamente modificada por la lisozima de huevo de gallina. Se seleccionó un fago reactivo a rhEPO en 4 rondas de inmunoadsorción. Para conservar la población de clones C24 que, después de la mutagénesis, todavía pueden unirse a la lisozima de huevo de gallina, tras la primera ronda de selección sobre rhEPO se realizó una ronda de inmunoadsorción de la población de fagos sobre lisozima de huevo de gallina (1 mg/ml en PBS). Se revistieron con 200 μ l de rhEPO los 5 pocillos de la placa de microtitulación (Maxisorb, Nunc) en tampón Na-carbonato 0,1 M, pH 9,6, en concentraciones decrecientes en posteriores rondas de inmunoadsorción (véase la siguiente tabla). Después de bloquear con M-PBS al 2%, se dejó que se uniesen los fagos en el agente bloqueante a temperatura ambiente durante 2 h. Después de 20 lavados con T-PBS y 20 con PBS, se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,2, y se neutralizó con Tris 2 M. El fago eluido se empleó inmediatamente para infectar TG-1 en crecimiento exponencial. Las células infectadas se seleccionaron en un medio que contenía ampicilina. Las partículas de los fagos se rescataron de los sobrenadantes del cultivo tras una superinfección con el fago auxiliar M13-KO7, se concentraron con PEG y se emplearon en otra ronda de inmunoadsorción. Se determinó el número de fagos de entrada y de salida en forma de unidades transformantes de *E. coli* después de cada ronda de inmunoadsorción (tabla 8).

Tabla 8

Ronda de inmunoadsorción	Antígeno	Fagos de entrada (TU/ml)	Fagos de salida (TU/ml)
1	rhEPO, 500 μ g/ml	$6,32 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^5$
2	lisozima, 1 mg/ml	$6,16 \times 10^{15}$	$4,53 \times 10^{10}$
3	rhEPO, 100 μ g/ml	$6,07 \times 10^{15}$	$6,78 \times 10^{10}$
4	rhEPO, 50 μ g/ml	$8,42 \times 10^{15}$	$3,0 \times 10^{11}$
5	rhEPO, 50 μ g/ml	$5,12 \times 10^{15}$	$4,28 \times 10^{10}$

Las colonias resultantes se rasparon de las placas, se cultivaron en 2xYT con ampicilina y su ADN plasmídico se aisló con un midi-prep. Los insertos se amplificaron con una PCR, y después se subclonaron en el vector pNOTBAD y se transformaron en una cepa E104 de *E. coli*. Se cultivaron 4 x 72 colonias en 200 μ l de 2xYT con ampicilina y se indujeron con L-arabinosa al 0,1% al día siguiente. Después de 24 h de expresión a 16 °C se lisaron con 200 μ l de tampón Na-borato, pH 8,0, durante 6 h a 4 °C, y se empleó el extracto periplásmico en un ELISA.

Para el ELISA se revistieron placas Maxisorb con lisozima de huevo de gallina en PBS (20 μ g/ml) o rhEPO en tampón Na-carbonato 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37 °C. Después de bloquear con BSA-PBS al 1% se dejó que el extracto periplásmico en el mismo agente de bloqueo se uniese durante la noche. La unión se reveló con un anticuerpo anti-His₄ y un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con HRP (para la detección de la lisozima de huevo de gallina) o AP (para la detección de rhEPO). La reacción de color de la conversión de OPD (HRP) se leyó a 492/620 nm después de detener la reacción con H₂SO₄ 1,25 M, y se leyó la conversión de pNPP (AP) a 405/620 nm. Se seleccionaron 14 clones con unos valores de absorbancia prometedores para la expresión a una escala de 20 ml. Después de 24 h de inducción de arabinosa a 16 °C, las células se recogieron y se lisaron durante la noche en 1 ml de tampón Na-borato a 4 °C, y el lisado se empleó para un ELISA. El ELISA se realizó como se indicó anteriormente en 4 paralelos, y los pocillos sin extracto periplásmico y sin antígeno se utilizaron como controles negativos. Se lograron resultados (tabla 9) con el clon según SEQ ID NO:42, 43.

Tabla 9

Antígeno		Absorbancia tras la unión	Sin extracto periplásmico	Sin antígeno
lisozima	A _{492/620 nm}	0,299	0,110	0,018
rhEPO	A _{405/620 nm}	0,258	0,095	0,090

Ejemplo 16: Los dominios C_H3 modificados proporcionan biespecificidad en un formato de tipo Fab

En la construcción utilizada en este ejemplo, ambas cadenas V_L y V_H de un anticuerpo se condensan con un dominio C_H3 modificado.

La región V_L y V_H del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (He, X.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7154-7158; Kohl, J., *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1991, 646:106-114; Felgenhauer, M., *et al.*, Nucleic Acids Res., 1990, 18:4927), que reconoce un epitopo sobre gp41 del VIH-1, se utilizó como pareja de fusión para el clon C24 con el dominio C_H3 modificado, que se une específicamente a la lisozima de huevo de gallina.

Para estimular la formación del dímero VL-CH3/VH-CH3 a través de un enlace disulfuro, se añadieron restos Ser-Cys al C-terminal de la secuencia de C24.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, respectivamente, de las dos cadenas 3D6VL-C24 y 3D6VH-C24, se indican en SEQ ID NO:47, 46 y SEQ ID NO:45, 44, respectivamente.

Se diseñaron cebadores para permitir la amplificación de las regiones codificadoras, introduciendo sitios de restricción al mismo tiempo (mutaciones silenciosas) que se emplearon para acoplar entre sí las regiones codificadoras. Para la expresión de los genes se eligió el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Las construcciones se clonaron en vectores de expresión de *Pichia pastoris* adecuados: 3D6VL-C24 se clonó en pPIC9K (nombre final: pPIC9K3LC), y 3D6VH-C24 (nombre final: pPICZ3HC) se clonó en pPICZalphaA. La construcción pPICZ3HC se linealizó con *Bgl* II, se transformó en *Pichia pastoris* GS115 y los transformantes se seleccionaron en un medio sólido que contenía zeocina. Uno de los transformantes posteriormente se utilizó como célula hospedante para la construcción linealizada con *Sal* I pPIC9K3LC. Entonces se seleccionaron los dobles transformantes sobre un medio RDB.

Los clones se inoculan en 30 ml de medio YPG y se cultivan hasta $DO_{600} = 10$, y después se indujeron mediante la adición de metanol al 1% en medio BMMY. La inducción continuó durante 36 horas a 16 °C. Los sobrenadantes se retiraron mediante centrifugación y después se concentraron aproximadamente 10 veces. La presencia de la proteína recombinante se confirmó mediante una transferencia Western con un anticuerpo anti-His₄, y se calculó que estaba a una concentración de aproximadamente 50-100 µg/l de cultivo inicial.

Se realizaron unos primeros ensayos funcionales con 10x sobrenadante concentrado. En primer lugar se revistieron pocillos de placas Maxisorp con lisozima de huevo de gallina 20 µg/ml en PBS, o epitopo del anticuerpo 3D6 20 µg/ml en tampón Na-carbonato 0,1 M, pH 9,6, respectivamente, durante 1 h a 37 °C. Se empleó el epitopo de 3D6 en forma de una proteína de fusión de GST producida de modo recombinante. Después de bloquear con BSA-PBS al 1% se dejó que los sobrenadantes concentrados se uniesen durante la noche en el mismo agente de bloqueo. La unión se reveló con un anticuerpo anti-His₄ y un anticuerpo anti-ratón de cabra, conjugado con HRP, y se visualizó como una reacción de cloro que resulta de la conversión de OPD a 492/620 nm (tabla 10).

Tabla 10

Antígeno	Señal de ELISA ($A_{492/620}$)	Fondo (sin antígeno)	Fondo (sin sobrenadante)
lisozima	0,198	0,003	0,043
epitopo de 3D6	0,061	0,001	0,007

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Rüker, Florian
- <120> Dominios de inmunoglobulinas sintéticas con propiedades de unión modificadas en regiones de la molécula diferentes de las regiones que determinan la complementariedad
- 10 <130> R 46751
- <140> PCT/EP2006/050059
- <141> 2006-01-05
- 15 <150> US 60/641144
- <151> 2005-01-05
- <160> 65
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 108
- <212> PRT
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15
- Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
20 25 30
- Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
35 40 45
- Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
50 55 60
- Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
65 70 75 80
- Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
85 90 95
- Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Ala Ala
100 105
- 30 <210> 2
- <211> 332
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <223> Secuencia Artificial
- <220>

<221> característica_misclánea
 <222> (57)..(58)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (60)..(61)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (63)..(64)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (219)..(220)
 <223> n is a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (222)..(223)
 <223> n is a, c, g, o t

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (225)..(226)
 <223> n is a, c, g, o t

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

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

40 <400> 2
 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat gagctcnnsn 60
 nsnscaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg 120
 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact 180
 ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc ttaccgtgnn snnsnnsagg tggnnnsnsg 240
 ggaacgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acacagaaga 300
 gcctctccct gtctccgggt aaagcggccg ca 332

45 <210> 3
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (19)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (73)..(75)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (78)..(79)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3
 Met Ala Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1 5 10 15
 Glu Leu Xaa Xaa Xaa Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 50 55 60
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Xaa Xaa Xaa Arg Trp Xaa Xaa Gly
 65 70 75 80
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 85 90 95
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ala Ala Ala
 100 105 110

15 <210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 4
 25 cttgccatgg ccccccgaga accacaggtg tac 33

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 5
 35 agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg 30

5 <210> 6
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (11)..(12)
 <223> n is a, c, g, o t
 15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (14)..(15)
 <223> n is a, c, g, o t
 20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (17)..(18)
 <223> n is a, c, g, o t
 25 <400> 6
 gtacgagctc nnsnnsnsc aagtcagcct gacctgcctg g 41
 30 <210> 7
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 35 <400> 7
 tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg 32
 40 <210> 8
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (17)..(18)
 <223> n is a, c, g, o t
 55 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (20)..(21)
 <223> n is a, c, g, o t
 60 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (23)..(24)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (32)..(33)

<223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 5 <222> (35)..(36)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 8
 10 tgccaagctt accgtgnnsn nsnsaggtg gnnsnsggg aacgtcttct catgctccg 59
 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <400> 9
 20 agttgcggcc gcttaccgc gagacagga gag 33
 <210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> característica_misclánea
 <222> (19)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 35 <221> característica_misclánea
 <222> (73)..(78)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 40 <221> característica_misclánea
 <222> (81)..(82)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 45 <400> 10

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

Ala

5 <210> 11
<211> 341
<212> DNA
<213> Artificial
10 <220>
<223> Secuencia Artificial
15 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (57)..(58)
<223> n is a, c, g, o t
20 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (60)..(61)
<223> n is a, c, g, o t
25 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (63)..(64)
<223> n is a, c, g, o t
30 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (219)..(220)
<223> n is a, c, g, o t
35 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (222)..(223)
<223> n is a, c, g, o t
<220>
<221> característica_miscelánea

<222> (225)..(226)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (228)..(229)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (231)..(232)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (234)..(235)
 <223> n is a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (243)..(244)
 <223> n is a, c, g, o t

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (246)..(247)
 <223> n is a, c, g, o t

<400> 11 __
 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtgac gagctcnnsn 60
 nsnnscaagt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg 120
 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact 180
 ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc ttaccgtgnn snnsnnsnns nnsnnsaggt 240
 ggnnsnsgg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca 300
 cacagaagag cctctccctg tctccgggta aagcgccgc a 341

30

<210> 12
 <211> 68
 <212> DNA
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (17)..(18)
 <223> n is a, c, g, o t

45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (20)..(21)
 <223> n is a, c, g, o t

50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (23)..(24)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (26)..(27)
 <223> n is a, c, g, o t
 10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (29)..(30)
 <223> n is a, c, g, o t
 15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (32)..(33)
 <223> n is a, c, g, o t
 20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (41)..(42)
 <223> n is a, c, g, o t
 25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (44)..(45)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 12
 tgccaagctt accgtgnnsn nsnsnsnsn snnsaggtgg nnsnnsggga acgtcttctc 60
 atgctccg 68
 30 <210> 13
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (19)..(21)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (73)..(80)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (83)..(84)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 13

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

- 5 <210> 14
<211> 347
<212> DNA
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (57)..(58)
<223> n is a, c, g, o t
- 20 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (60)..(61)
<223> n is a, c, g, o t
- 25 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (63)..(64)
<223> n is a, c, g, o t
- 30 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (219)..(220)
<223> n is a, c, g, o t
- <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (222)..(223)
<223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (225)..(226)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (228)..(229)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (231)..(232)
 <223> n is a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (234)..(235)
 <223> n is a, c, g, o t

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (237)..(238)
 <223> n is a, c, g, o t

30 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (240)..(241)
 <223> n is a, c, g, o t

35 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (249)..(250)
 <223> n is a, c, g, o t

40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (252)..(253)
 <223> n is a, c, g, o t

<400> 14
 ccattggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtgac gagctcnnsn 60
 nsnnscaagt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg 120
 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact 180
 ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc ttaccgtgnn snnsnnsnns nnsnnsnnsn 240
 nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc 300
 actacacaca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaagc ggccgca 347

45 <210> 15
 <211> 74
 <212> DNA
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <220>

	<221> característica_misclánea	
	<222> (17)..(18)	
	<223> n is a, c, g, o t	
5	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (20)..(21)	
	<223> n is a, c, g, o t	
10	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (23)..(24)	
	<223> n is a, c, g, o t	
15	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (26)..(27)	
	<223> n is a, c, g, o t	
20	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (29)..(30)	
	<223> n is a, c, g, o t	
25	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (32)..(33)	
	<223> n is a, c, g, o t	
30	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (35)..(36)	
	<223> n is a, c, g, o t	
35	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (38)..(39)	
	<223> n is a, c, g, o t	
40	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (47)..(48)	
	<223> n is a, c, g, o t	
45	<220>	
	<221> característica_misclánea	
	<222> (50)..(51)	
	<223> n is a, c, g, o t	
50	<400> 15	
	tgccaagctt accgtgnnsn nsnnnsnnsn snnsnnsnns aggtggnsn nsgggaacgt	60
	cttctcatgc tccg	74
	<210> 16	
	<211> 110	
55	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia Artificial	
60		

ES 2 384 039 T3

<400> 16

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

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

10 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 17

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctcgg ctggccgcaa 60
 gtcagcctaa cctgcctggt caaaggcttc tatccagcgg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg cccaagcggg ggtgcgtgag cgtcaggtgg 240
 cccccgggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

15 <210> 18
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 18

ES 2 384 039 T3

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

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

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

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

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ile Pro Phe Cys Arg Met Ser Pro Arg Trp
65 70 75 80

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

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

5 <210> 19
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 19
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattcccgtg acgagctctc ggtgtcgcaa 60
gtcagcccga cctgcctggg caaaggcttc tatcccagcg acatcgaggt ggagtgaggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg atcccccttct gcaggatgag ccccaggtgg 240
tggatcggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

15 <210> 20
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 20

ES 2 384 039 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

5 <210> 21
<211> 315
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 21 __
cctcgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctcga ggcgctgcaa 60
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg cggcgcaaca ggtggtcctg ggggaacgtc 240
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
ctgtctccgg gtaaa 315

15 <210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 22

ES 2 384 039 T3

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

<210> 23
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 23
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggtg acgagctcca ggggagccaa 60
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg aagtcgcgcg ccacccggag gtgggtgggtg 240
 gggaacgtct tttcttgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacacagaag 300
 aacctctccc tgtctccggg taaa 324

<210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 24

ES 2 384 039 T3

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

<210> 25
<211> 324
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 25
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctcgc gatcggccaa 60
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg cgctcgacga gggacaacag gtggctggtg 240
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggcctctgc acaaccacta cacacagaag 300
agcctctccc tgtctccggg taaa 324

<210> 26
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 26

ES 2 384 039 T3

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

<210> 27
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 27
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtag acgagctcag cggggcgcaa 60
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg tggttcaggc aggagggcgg catgaggtgg 240
 ttcgcgggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

<210> 28
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 28

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

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

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

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

Tyr Gly Lys Leu Thr Val Pro Pro Arg Leu Lys Gly Trp Pro Arg Trp
65 70 75 80

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

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

<210> 29
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 29
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctcgt cttggggcaa 60
gtcagcccga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tccttcttcc tctacggcaa gcttaccgtg cccccgcggt tgaagggctg gccgaggtgg 240
ggctggggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

<210> 30
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 30
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
1 5 10 15

ES 2 384 039 T3

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

5 <210> 31
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 31
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggtg acgagctcct ggcgtaccaa 60
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg gtggccggca ggtggacgtg cggaacgtc 240
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
 ctgtctccgg gtaaa 315

15 <210> 32
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <400> 32

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

5 <210> 33
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 33
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccattcccggtg acgagctctg cgtccccgcaa 60
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tcctttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg gtgctcaagg tcgtgcaggc gcgcaggtgg 240
gaggtgggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 300
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 330

15 <210> 34
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia Artificial
<400> 34

ES 2 384 039 T3

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

5 <210> 35
<211> 315
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 35
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgga acgagctcgg catcgcgcaa 60
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaacgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tctttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ttggggcgca ggtggaccct ggggaacgtc 240
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
ctgtctccgg gtaaa 315

15 <210> 36
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia Artificial
<400> 36

ES 2 384 039 T3

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

<210> 37
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 37
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggtg acgagctcgg catcgcgcaa 60
 gtcagcttga cctgcctggt caaaggcttt tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaacgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagaa gcttaccgtg ttgggccgca ggtggaccct ggggaacgtc 240
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
 ctgtctccgg gtaaa 315

<210> 38
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 38

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

<210> 39
<211> 315
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 39
ccccgagaac cacagggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctctt gccctgccaa 60
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
tctttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ttctgccccca ggtggctggg ggggaacgtc 240
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
ctgtctccgg gtaaa 315

<210> 40
<211> 105
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 41

ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 60
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 120
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 180
 tccttcttcc tctacagcaa gcttaccgtg ccctgcatga ggtggtgggg cgggaacgtc 240
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa gagcctctcc 300
 ctgtctccgg gtaaa 315

<210> 42
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 42

ES 2 384 039 T3

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

<210> 43
<211> 345
5 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia Artificial

<400> 43
cggcgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgtg acgagctcgt cttggggcaa 60
gtcagcctgg cctgcctcgt gaaaggcttc gtggtccggt tgatcgccgt ggagtgggag 120
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgttctaga ctccgacggc 180
cggcagttgg cggactcctt cttcctctac agcaagctta ccgtgcccc gcggttgaag 240
ggctggccga ggtggggctg ggggaacgtc ttctcatgca gtgtgatgtt cctggcgctg 300
cacaaccact acacacagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaa 345

<210> 44
15 <211> 238
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> Secuencia Artificial

<400> 44

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Lys Gly Arg Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

Thr Lys Gly Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
130 135 140

Val Leu Gly Gln Val Ser Pro Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Gly Lys Leu Thr Val Pro Pro Arg Leu Lys Gly Trp Pro Arg Trp
195 200 205

Gly Trp Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
210 215 220

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<211> 714
<212> DNA
<213> Artificial

5 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 45
gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttaat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt ataagttggg atagtagtag tataggctat 180
gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac atggccttat attactgtgt aaaaggcaga 300
gattactatg atagtgggtg ttatttcacg gttgcttttg atatctgggg ccaagggaca 360
atggtcaccg tctcttcagc ctccaccaag ggcccacagg tgtacaccct gcccccatcc 420
cgtgacgagc tcgtcttggg gcaagtcagc ccgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 480
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 540
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctctacg gcaagcttac cgtgcccccg 600
cggttgaagg gctggccgag gtggggctgg gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 660
gaggctctgc acaaccacta cacacagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 714

10 <210> 46
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia Artificial

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 47

gacatccaga tgacccagtc tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gagtattagt aggtggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagtcc ctaagctcct gatctataag gcatctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gatgattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attctttcgg ccctgggacc 300
aaagtggata tcaaacgaac tgtggctgaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgt 360
gacgagctcg tcttggggca agtcagccccg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 420
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 480
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacggca agcttaccgt gccccgcgg 540
ttgaagggtt ggccgaggtg gggctggggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 651

<210> 48
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (35)..(36)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (38)..(42)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> característica_misclánea
<222> (95)..(98)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 48

ES 2 384 039 T3

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

Ala

<210> 49
<211> 387
<212> DNA
5 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> característica_misclánea
<222> (103)..(104)
<223> n is a, c, g, o t

15 <220>
<221> característica_misclánea
<222> (106)..(107)
<223> n is a, c, g, o t

20 <220>
<221> característica_misclánea
<222> (112)..(113)
<223> n is a, c, g, o t

25 <220>
<221> característica_misclánea
<222> (115)..(116)
<223> n is a, c, g, o t

30 <220>
<221> característica_misclánea
<222> (118)..(119)

<223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 5 <222> (121)..(122)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 10 <222> (124)..(125)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 15 <222> (283)..(284)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 20 <222> (286)..(287)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 25 <222> (289)..(290)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 30 <222> (292)..(293)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 49
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgccat cttnsnnsca gnnsnnsns 120
 nnsnsgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 180
 tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 240
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgt tgnnsnnsnn snnstacgag 300
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 360
 agcttcaaca ggggagaggc ggccgca 387
 35 <210> 50
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> característica_misclánea
 45 <222> (35)..(36)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <220>
 50 <221> característica_misclánea
 <222> (38)..(42)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (95)..(101)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 50
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 20 25 30
 Pro Ser Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Ser Val Val Cys Leu
 35 40 45
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 50 55 60
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Xaa Xaa
 85 90 95
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 100 105 110
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 115 120 125
 Glu Ala Ala Ala
 130
 10 <210> 51
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> característica_miscelánea
 20 <222> (103)..(104)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_miscelánea
 25 <222> (106)..(107)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_miscelánea
 30 <222> (112)..(113)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_miscelánea
 35 <222> (115)..(116)

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

<220>
 <221> característica_misclánea
 5 <222> (118)..(119)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 10 <222> (121)..(122)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 15 <222> (124)..(125)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 20 <222> (283)..(284)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 25 <222> (286)..(287)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 30 <222> (289)..(290)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 35 <222> (292)..(293)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 40 <222> (295)..(296)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 45 <222> (298)..(299)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>
 <221> característica_misclánea
 50 <222> (301)..(302)
 <223> n is a, c, g, o t

<400> 51
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat cttnsnnsca gnnsnnsnns 120
 nnsnns gcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 180
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 240
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgt tgnsnnsn snnsnnsnns 300
 nnstacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 360

gtcacaaaga gcttcaacag gggagaggcg gccgca

396

5 <210> 52
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (35)..(36)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (38)..(42)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (95)..(103)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 52

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

<210> 53

<211> 402
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (103)..(104)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (106)..(107)
 <223> n is a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (112)..(113)
 <223> n is a, c, g, o t

25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (115)..(116)
 <223> n is a, c, g, o t

30 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (118)..(119)
 <223> n is a, c, g, o t

35 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (121)..(122)
 <223> n is a, c, g, o t

40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (124)..(125)
 <223> n is a, c, g, o t

45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (283)..(284)
 <223> n is a, c, g, o t

50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (286)..(287)
 <223> n is a, c, g, o t

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

60 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (292)..(293)
 <223> n is a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misclánea
 <222> (295)..(296)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (298)..(299)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (301)..(302)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (304)..(305)
 <223> n is a, c, g, o t

20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (307)..(308)
 <223> n is a, c, g, o t

25 <400> 53 _ _
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat cttnsnnsca gnnsnnsns 120
 nnsnsgcct ctgtgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 180
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 240
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgt tgnnsnnsnn snnsnnsns 300
 nnsnnsnst acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc 360
 tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gaggcggccg ca 402

30 <210> 54
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (38)..(45)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (95)..(101)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

 <400> 54

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

- 5 <210> 55
<211> 381
<212> DNA
<213> Artificial
- 10 <220>
<223> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (112)..(113)
<223> n is a, c, g, o t
- 20 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (115)..(116)
<223> n is a, c, g, o t
- 25 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (118)..(119)
<223> n is a, c, g, o t
- 30 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (121)..(122)
<223> n is a, c, g, o t
- 35 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (124)..(125)

<223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 5 <222> (127)..(128)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 10 <222> (130)..(131)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 15 <222> (133)..(134)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 20 <222> (283)..(284)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 25 <222> (286)..(287)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 30 <222> (289)..(290)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 35 <222> (292)..(293)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 40 <222> (295)..(296)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 45 <222> (298)..(299)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 50 <222> (301)..(302)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 55

```

atgaaatācc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc      60
atggccgcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc cnsnsnsns      120
nnsnsnsnsn nsnsgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg      180
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag      240
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc ccnsnsnsn snsnsnsns      300
nnsacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagaaagtt      360
gagcccaaat ctgcggccgc a                                              381

```

5
 <210> 56
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia Artificial

15
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (49)..(50)
 <223> n is a, c, g, o t

20
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (52)..(53)
 <223> n is a, c, g, o t

25
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (58)..(59)
 <223> n is a, c, g, o t

30
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (61)..(62)
 <223> n is a, c, g, o t

35
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (64)..(65)
 <223> n is a, c, g, o t

40
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (67)..(68)
 <223> n is a, c, g, o t

45
 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (70)..(71)
 <223> n is a, c, g, o t

<400> 56

```

cttaccatgg ccgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctnn snnscagnns      60
nnsnsnsnsn nsgcctctgt tgtgtgc                                              87

```

5 <210> 57
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 10 <400> 57
 tgacaacgtc aggggtgctgc tgaggc 26
 <210> 58
 <211> 41
 <212> DNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (12)..(13)
 <223> n is a, c, g, o t
 25 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (15)..(16)
 <223> n is a, c, g, o t
 30 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (18)..(19)
 <223> n is a, c, g, o t
 35 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g, o t
 40 <400> 58
 tcagaacgtt gnnsnnsnns nnstacgaga aacacaaagt c 41
 <210> 59
 <211> 50
 45 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (12)..(13)
 <223> n is a, c, g, o t
 55 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (15)..(16)
 <223> n is a, c, g, o t
 60 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (18)..(19)

<223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 5 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 10 <222> (24)..(25)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 15 <222> (27)..(28)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_misclánea
 20 <222> (30)..(31)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 59
 25 tcagaacgtt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nstacgagaa acacaaagtc 50
 <210> 60
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <221> característica_misclánea
 <222> (12)..(13)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 40 <221> característica_misclánea
 <222> (15)..(16)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 45 <221> característica_misclánea
 <222> (18)..(19)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 50 <221> característica_misclánea
 <222> (21)..(22)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 55 <221> característica_misclánea
 <222> (24)..(25)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>
 60 <221> característica_misclánea
 <222> (27)..(28)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (30)..(31)
 <223> n is a, c, g, o t
 10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (33)..(34)
 <223> n is a, c, g, o t
 15 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (36)..(37)
 <223> n is a, c, g, o t
 <400> 60
 tcagacggtt gnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnnsnnsta cgagaaacac aaagtc 56
 20 <210> 61
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 <400> 61
 catcgcggcc gcctctcccc tgttgaagct c 31
 30 <210> 62
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (58)..(59)
 <223> n is a, c, g, o t
 45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (61)..(62)
 <223> n is a, c, g, o t
 50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (64)..(65)
 <223> n is a, c, g, o t
 55 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (67)..(68)
 <223> n is a, c, g, o t
 60 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (70)..(71)
 <223> n is a, c, g, o t
 <220>

<221> característica_misclánea
 <222> (73)..(74)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (76)..(77)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (79)..(80)
 <223> n is a, c, g, o t

15 <400> 62
 acgtccatgg cgcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctcctccnns 60
 nnsnnsnnsn nsnnsnnsnn sgccctgggc tgcctggtc 99

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

25 <220>
 <223> Secuencia Artificial

<400> 63
 ggcacggtca ccacgtgct gag 23

30 <210> 64
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (19)..(20)
 <223> n is a, c, g, o t

45 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (22)..(23)
 <223> n is a, c, g, o t

50 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (25)..(26)
 <223> n is a, c, g, o t

55 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (28)..(29)
 <223> n is a, c, g, o t

60 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (31)..(32)
 <223> n is a, c, g, o t

5 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (34)..(35)
 <223> n is a, c, g, o t

10 <220>
 <221> característica_misclánea
 <222> (37)..(38)
 <223> n is a, c, g, o t

<400> 64
 agcgtggtga ccgtgcccnn snnsnnsnns nnsnnsnnsa cctacatctg caacgtgaat 60
 c 61

15 <210> 65
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia Artificial

25 <400> 65
 catagcggcc gcagatttgg gctcaacttt ctgtc 36

REIVINDICACIONES

- 1.- Un dominio variable de inmunoglobulina, o una parte de este, que comprende al menos una región de bucle estructural de un dominio variable de la cadena pesada o ligera de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha al menos una región de bucle estructural al menos una modificación para proporcionar un sitio de unión que no es una CDR que se une a un epítipo de un antígeno, no uniéndose dicha región de bucle estructural no modificada a dicho epítipo, en el que dicha modificación comprende una mutagénesis en un bucle inferior seleccionado del grupo que consiste en los bucles que conectan las cadenas beta A-B, C-C', C''-D y E-F del dominio variable.
- 2.- Una inmunoglobulina según la reivindicación 1, en la que dicha región de bucle modificada está en cualquiera de un dominio Vh o Vl.
- 3.- Una inmunoglobulina según la reivindicación 1 o 2, en la que dicha región de bucle modificada está en la región C-terminal.
- 4.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un dominio bivalente o biespecífico.
- 5.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende un único dominio de inmunoglobulina o un Fv monocatenario.
- 6.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con al menos dos regiones de bucles estructurales modificadas.
- 7.- Una inmunoglobulina que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha región de bucle estructural modificada comprende al menos 6 modificaciones de aminoácidos.
- 8.- Una molécula que comprende al menos una inmunoglobulina modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos otra molécula de unión, en la que dicha otra molécula de unión se selecciona del grupo de inmunoglobulinas, receptores solubles, ligandos, ácidos nucleicos, y carbohidratos.
- 9.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se caracteriza porque dicha modificación está dentro de un dominio variable humano en una de las posiciones de los aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 89 a 101, en la que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT.
- 10.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se caracteriza porque dicha modificación está dentro de un dominio variable murino en una de las posiciones de los aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 44 a 52, los aminoácidos 67 a 76, y los aminoácidos 92 a 101, en la que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT.
- 11.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que tiene especificidad de unión por un antígeno seleccionado del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados a tumores, autoantígenos, enzimas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos víricos y antígenos protozoarios.
- 12.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que tiene especificidad de unión por FcRn.
- 13.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que tiene especificidad de unión por una molécula efectora.
- 14.- Una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende una inmunoglobulina humana, humanizada, quimérica, murina o de camello, o sus homólogos.
- 15.- Un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 16.- Una preparación farmacéutica que contiene una inmunoglobulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

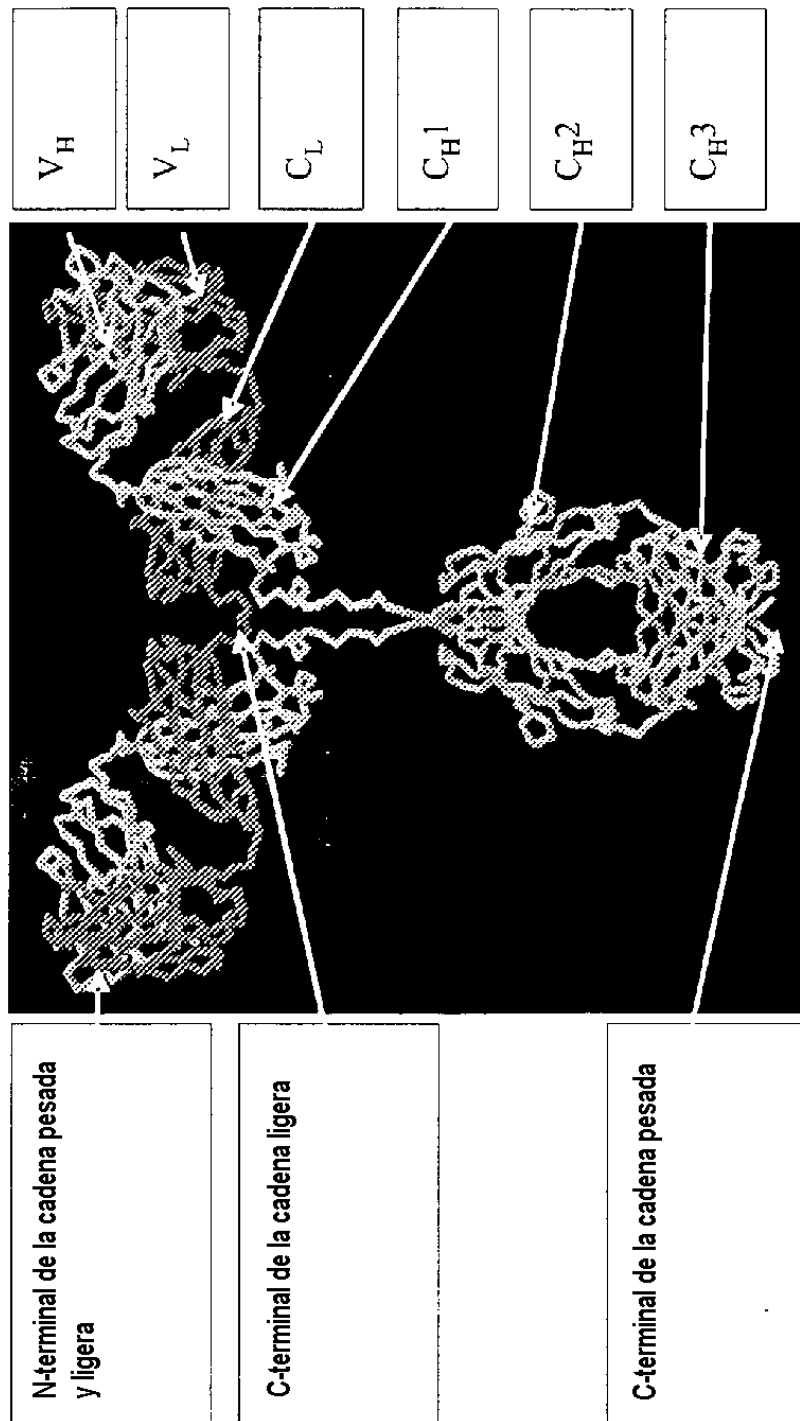


Fig. 1a

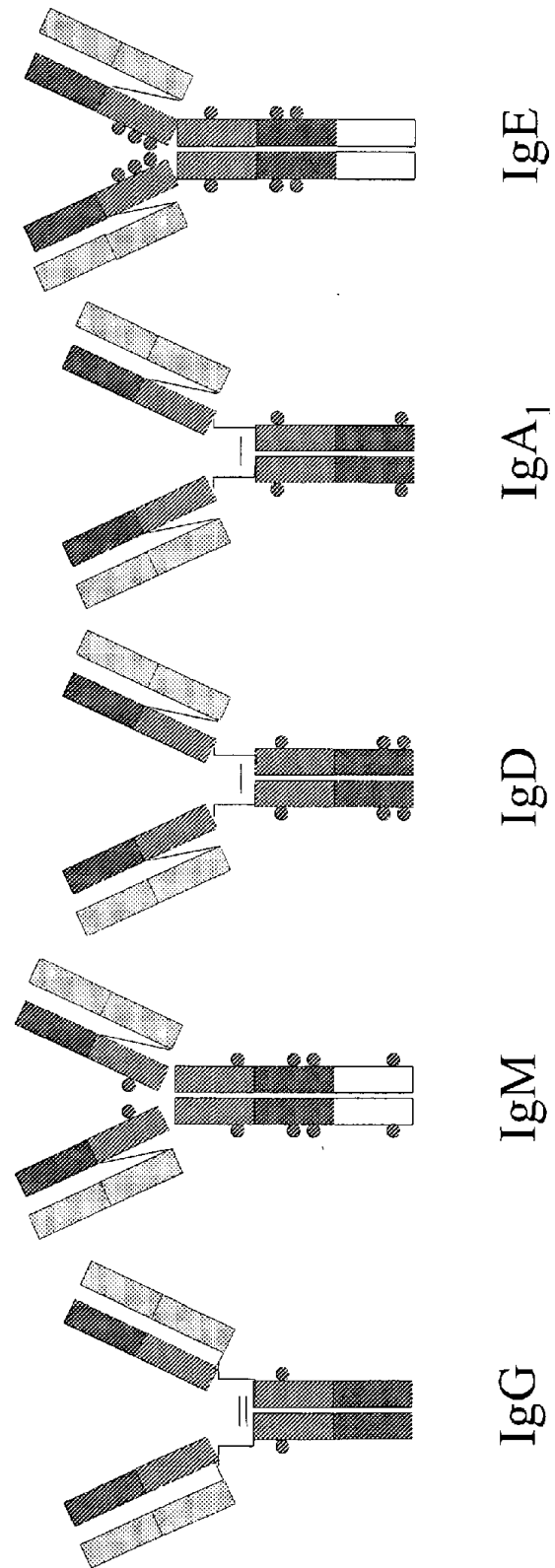


Fig. 1b

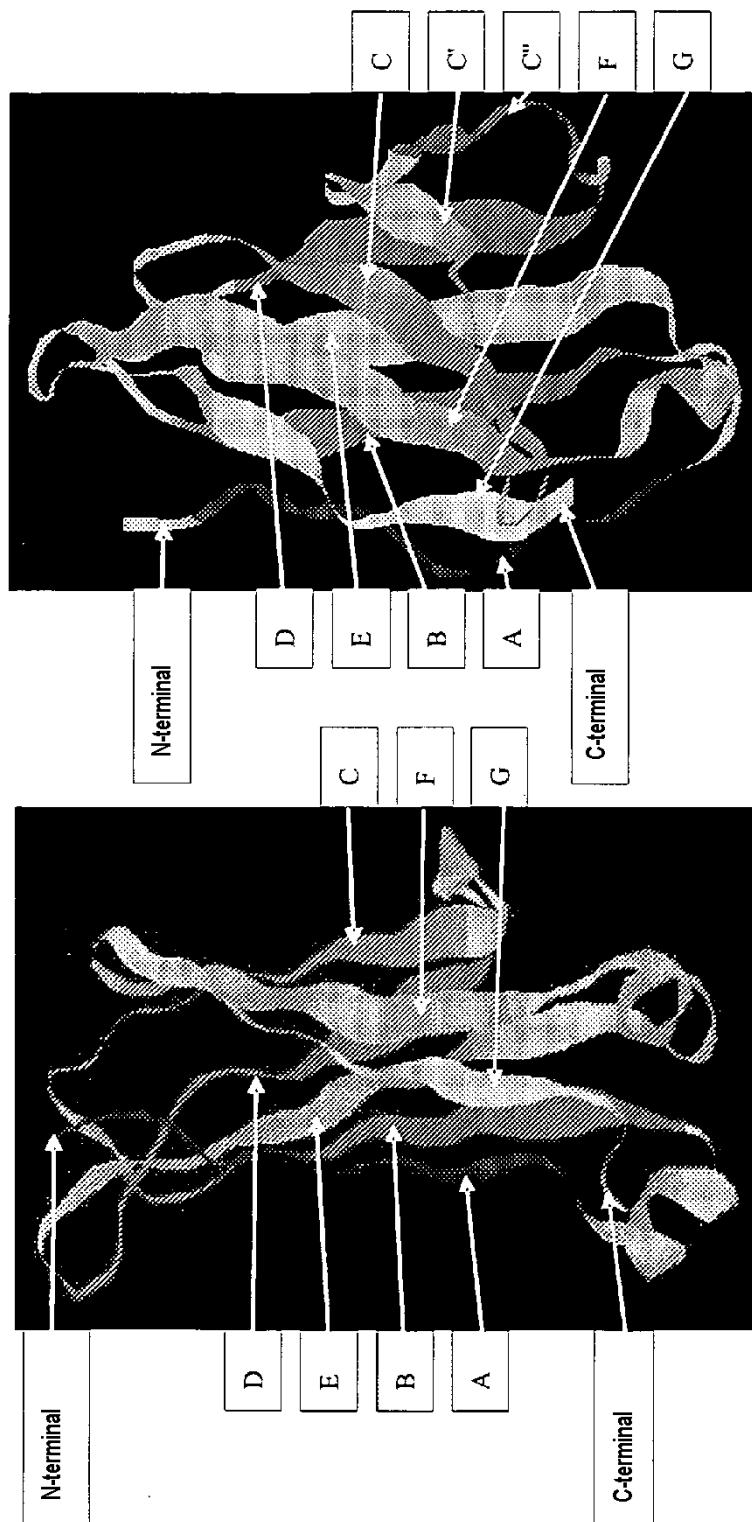


Fig. 2

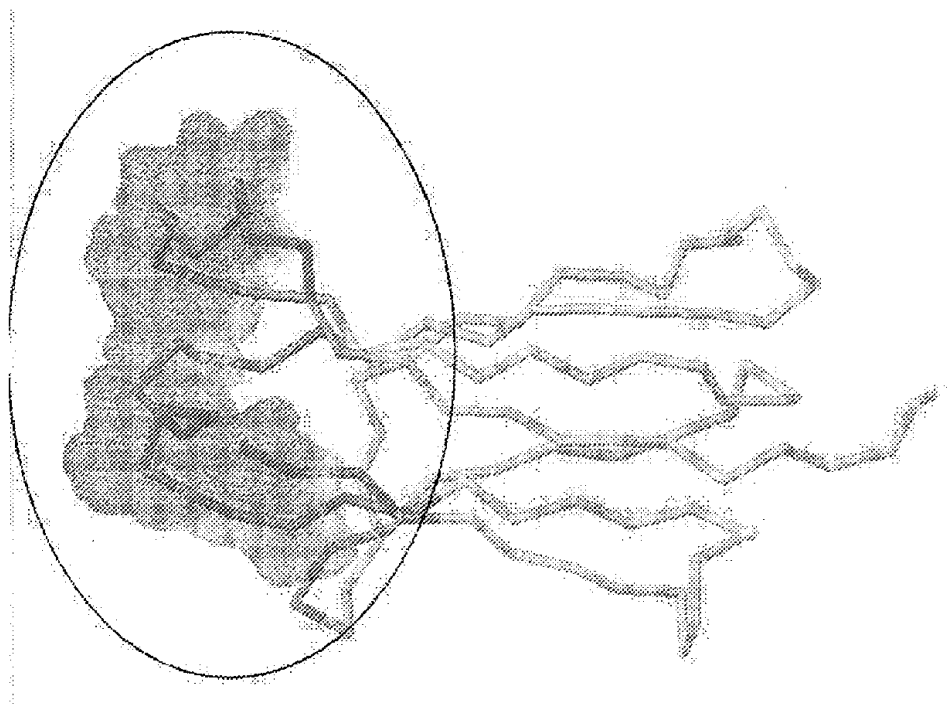


Fig. 3

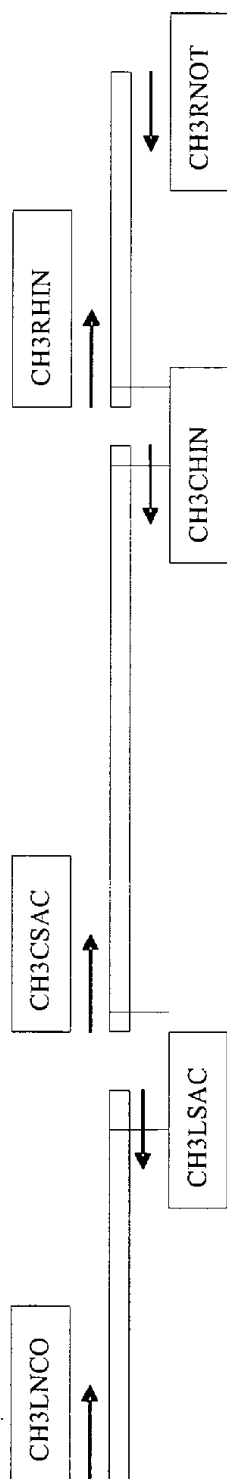


Fig. 4

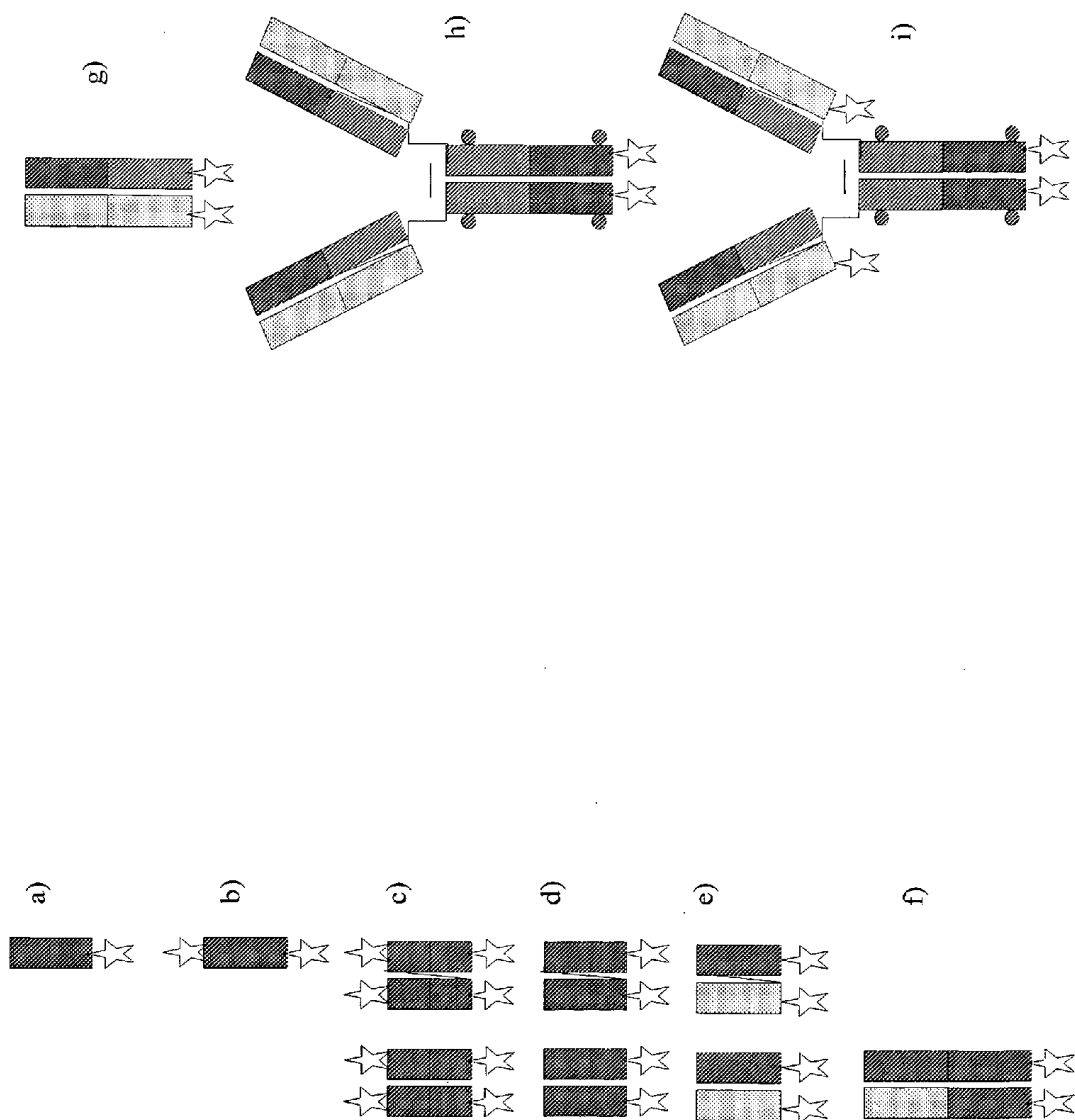


Fig. 5

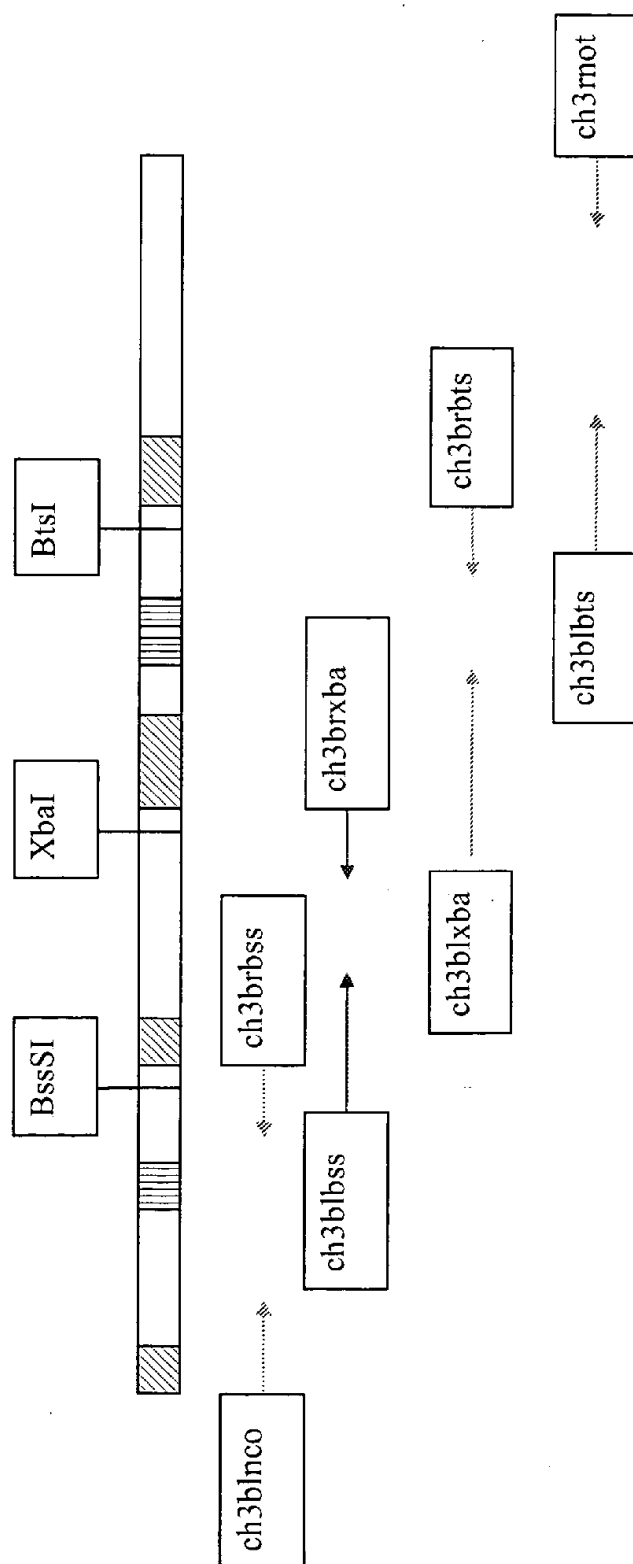


Fig. 6


```

+3  R E P Q V Y T L P P S R D E L Q V S L T C L V K G F
1  NNSCGAGAAC CACAGGTGTA CACCCTGCCC CCATCCCGTG ACAGCTCENN SNNSNNSCAA GTGAGCCTGA CTGCTCTCTG GAAGCCTTC NNSNNSNNSN
   NNSGCTCTTG GTGTCCACAT GTGGGACGGG GTTAGGGCAC TGCTCGAGNN SNNSNNSGTT CAGTCGGACT GGACGGAGCA CTTTCCGAAG NNSNNSNNSN

+3  I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
101 NSATCGCGGT GGAGTGGGAG AGCAATGGC AGCCGGAGAA CAACTACAAG ACCACGCCCTC CCGTCTCTGA CTCGACGGC NNSNNSNNSN NNSNNSCTCTT
   NSTAGCGGCA CCTCACCCCTC TCGTTACCCG TCGGCCCTCTT GTTGATGTTT TGGTGGGGAG GGCAAGATCT GAGGTGCCG NNSNNSNNSN NSNNSAGGAA

+3  F L Y S K L T V R W G N V F S C S V M L H N H Y T
201 CTTCTCTAC AGCAGCTTA CCGTGNNNSN SNNSAGGTGG NNSNNSGGGA ACGTCTTCTC ATGCACTCTG ATCNNSNNSN NSCTGCACAA CCACTACACA
   GAAGGAGATG TCGTTCCGAAT GGCACNNSN SNNSNNSCCCT TGCAGAAGAG TACGTACAC TACNNSNNSN NSGACGTGTT GGTGATGTGT

+3  Q K S L S L S P G K A A A
301 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA GCGGCCGCA
   GTCTTCTCGG AGAGGACAG AGGCCCATTT CGCCGGCGT

```

Fig. 7

Fig. 8

1 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
31 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG
61 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
91 HNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID NO:1: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3 del anticuerpo1oqo.pdb

5 SEQ ID NO:2: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3 modificado del ejemplo 1

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

SEQ ID NO:3: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3 modificado del ejemplo 1

1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
61 DGSFFLYSKLTVXXXRWXXGNV FSCSVMHE
91 ALHNH YTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID NO:4: Cebador de PCR C_H3LNCO

10 **cttgccatgg ccccccgaga accacaggtg tac**

SEQ ID NO:5: Cebador de PCR C_H3LSAC

agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg

SEQ ID NO:6: Cebador de PCR C_H3CSAC

15

Figura 8 continuación

gtacgagctc nnsnnsnsc aagtcagcct gacctgcctg g

SEQ ID NO:7: Cebador de PCR C_H3CHIN

tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg

SEQ ID NO:8: Cebador de PCR C_H3RHIN

5 **tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsaggtg gnnsnsggg aacgtcttct catgctccg**

SEQ ID NO:9: Cebador de PCR C_H3RNOT

agttgcggcc gctttaccg gagacagga gag

SEQ ID NO:10: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3+3 modificado

1 M A P R E P Q V Y T L P P S R D E L X X X Q V S L T C L V K
31 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
61 D G S F F L Y S K L T V X X X X X R W X X G N V F S C S V
91 M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K A A A

10 SEQ ID NO:11: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3+3 modificado

1 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccgtgac gagctcnnsn
61 nsnnscaagt cagcctgacc tgcctgtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg
121 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact
181 ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc ttaccgtgnn snsnnsnns nsnnsaggt
241 ggnsnsgg gaacgtctc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca
301 cacagaagag cctctccctg tctccggga aagcgccgc a

SEQ ID NO:12: Cebador de PCR C_H3RHIN3

1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnnsnnsn snnsaggtg gnnsnsggga acgtcttctc
61 atgctccg

SEQ ID NO:13: Secuencia de aminoácidos del dominio C_H3+5 modificado

15

Figura 8 continuación

1 MAPREPQVYTLPPSRDELXXXQVSLTCLVK
 31 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
 61 DGSFFLYSKLTVXXXXXXXXXXRWXXGNVFSC
 91 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAA

SEQ ID NO:14: Secuencia de nucleótidos del dominio C_H3+5 modificado

1 ccatggcccc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgtag gagctcnnsn
 61 nsnnscaagt cagcctgacc tgcctgtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg
 121 agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact
 181 ccgacggctc ctctctctc tacagcaagc ttaccgtggn snsnnsnns nsnnsnnsn
 241 nsaggtggnn snnsgggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc
 301 actacacaca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaagc ggccgca

SEQ ID NO:15: Cebador de PCR C_H3RHIN5

1 tgccaagctt accgtgnnsn nsnsnnsnn snsnnsnns aggtggnnsn nsgggaacgt
 61 ctctcatgc tccg

5

SEQ ID NO:16: Secuencia de aminoácidos del clon D07 anti-EpCAM

PREPQVYTLPPSRDELGWPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKL
 TVPKRWCVSVRWPPGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:17: Secuencia de nucleótidos del clon D07 anti-EpCAM

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCTGGCCGCAAGTCA
 GCCTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
 GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
 ACAGCAAGCTTACCGTGCCCAAGCGGTGGTGCGTGAGCGTCAGGTGGCCCCCGGGGAACGTCTT
 CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
 CGGGTAAA

10 SEQ ID NO:18: Secuencia de aminoácidos del clon C67 anti-EpCAM

Figura 8 continuación

PREPQVYTLPPSRDELSVSQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVIPFCRMSPRWWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:19: Secuencia de nucleótidos del clon C67 anti-EpCAM

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTCGGTGTGCAAGTCA
GCCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCAGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGATCCCCTTCTGCAGGATGAGCCCCAGGTGGTGGATCGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC
GGGTAAA

SEQ ID NO:20: Secuencia de aminoácidos del clon D64C3 antilfluoresceína

PREPQVYTLPPSRDELEALQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT
5 VRRNRWSWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:21: Secuencia de nucleótidos del clon D64C3 antilfluoresceína

CCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGAGGCGCTGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCGGCGCAACAGGTGGTCTTGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:22: Secuencia de aminoácidos del clon A68 antilsozima

PREPQVYTLPPSRDELQGSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVKSRATRRWVVGNVFSCSVMHEALHNHYTQKNLSLSPGK

10 SEQ ID NO:23: Secuencia de nucleótidos del clon A68 antilsozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCAGGGGAGCCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT

Figura 8 continuación

ACAGCAAGCTTACCGTGAAGTCGCGCGCCACCCGGAGGTGGGTGGTGGGGAACGTCTTTCTTG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAACCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA

SEQ ID NO:24: Secuencia de aminoácidos del clon B23 antilisozima

PREPQVYTLPPSRDELAIGQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT
VRSTRDNRWLVGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO:25: Secuencia de nucleótidos del clon B23 antilisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGCGATCGGCCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCGCTCGACGAGGGACAACAGGTGGCTGGTGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA

5

SEQ ID NO:26: Secuencia de aminoácidos del clon B40 antilisozima

PREPQVYTLPPSRDELSGAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVWFRQEGGMRWFAGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:27: Secuencia de nucleótidos del clon B40 antilisozima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCAGCGGGGCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTGGTTCAGGCAGGAGGGCGGCATGAGGTGGTTCGCGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

10 SEQ ID NO:28: Secuencia de aminoácidos del clon C24 antilisozima

Figura 8 continuación

PREPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYGKL
TVPPRLKGWPRWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:29: Secuencia de nucleótidos del clon C24 antilisoizima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA
GCCCCGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACGGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEQ ID NO:30: Secuencia de aminoácidos del clon D46 antilisoizima

PREPQVYTLPPSRDELAYQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLT
VVAGRWTCGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO:31: Secuencia de nucleótidos del clon D46 antilisoizima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCCTGGCGTACCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGGTGGCCGGCAGGTGGACGTGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:32: Secuencia de aminoácidos del clon D56 antilisoizima

PREPQVYTLPPSRDELCVPQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVVLKVVQARRWEVGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:33: Secuencia de nucleótidos del clon D56 antilisoizima

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTGCGTCCCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT

Figura 8 continuación

ACAGCAAGCTTACCGTGGTGCTCAAGGTCGTGCAGGCGCGCAGGTGGGAGGTGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAA

SEQ ID NO:34: Secuencia de aminoácidos del clon A23 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VLGRRWTLGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:35: Secuencia de nucleótidos del clon A23 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

5

SEQ ID NO:36: Secuencia de aminoácidos del clon A33 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELGIAQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VLGRRWTLGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:37: Secuencia de nucleótidos del clon A33 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGGCATCGCGCAAGTCA
GCTTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGTTGGGCCGCGAGGTGGACCCTGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

10

SEQ ID NO:38: Secuencia de aminoácidos del clon D2 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELLPCQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VFCPRWLGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 8 continuación

SEQ ID NO:39: Secuencia de nucleótidos del clon D2 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCTTGCCCTGCCAAGTCAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTTACCGTGTTCTGCCCCAGGTGGCTGGGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:40: Secuencia de aminoácidos del clon D68 anti-TLR9

PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
5 VPCMRWWGGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:41: Secuencia de nucleótidos del clon D68 anti-TLR9

CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA
GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTTACCGTGCCCTGCATGAGGTGGTGGGGCGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:42: Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 biespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima y a eritropoyetina, clon D72

RREPQVYTLPPSRDELVLGQVSLACLVKGFVVRLIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGRQLADSFF
10 LYSKLTVPPRLKGWPRWGWGNVFSCSVMFLALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 8 continuación

SEQ ID NO:43: Secuencia de nucleótidos del dominio CH3 biespecífico, mutado en ambos lados, que se une a lisozima y a eritropoyetina, clon D72

CGGCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCA
GCCTGGCCTGCCTCGTGAAAGGCTTCGTGGTCCGGTTGATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTTCTAGACTCCGACGGCCGGCAGTTGGCG
GACTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGG
GCTGGGGGAACGTCTTCTCATGCAGTGTGATGTTCTGGCGCTGCACAACCACTACACACAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

- 5 SEQ ID NO:44: Secuencia de aminoácidos de la construcción de tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-gp41 de VIH-1 y clon C24 antilisoizima (3D6-VH - C24)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSSSIGYADSVKG
RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMALYYCVKGRDYYDSGGYFTVAFDIWGQGTMTVSSASTKGPQ
VYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYGKLTVPPPRL
KGWPRWGWGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:45: Secuencia de nucleótidos de la construcción de tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-gp41 de VIH-1 y clon C24 antilisoizima (3D6-VH - C24)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG
GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATAAGTTGGGATAGTAGTAGTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAA
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGA
GAGCTGAGGACATGGCCTTATATTACTGTGTAAAAGGCAGAGATTACTATGATAGTGGTGGTTATT
TCACGGTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAG
GGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC
GGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACGGCA
AGCTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

AA

Figura 8 continuación

SEQ ID NO:46: Secuencia de aminoácidos de la construcción de tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-gp41 de VIH-1 y clon C24 antilisoizima (3D6-VL - C24)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQSSIRWLAWYQQKPGKVPKLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGT
EFTLTISLQPDDEFATYYCQYNSYSFGPGTKVDIKRTVAEPQVYTLPPSRDELVLGQVSPTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYGKLTVPRLKGWPRWGWGNVFSVMSHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

- 5 SEQ ID NO:47: Secuencia de nucleótidos de la construcción de tipo Fab bivalente, que consiste en VH y VL del anticuerpo 3D6 anti-gp41 de VIH-1 y clon C24 antilisoizima (3D6-VL - C24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACT
TGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCC
TAAGCTCCTGATCTATAAGGCATCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGG
ATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTG
CCAACAGTATAATAGTTATTCTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGTGACGAGCTCGTCTTGGGGCAAGTCAGCCCGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACGGCAAG
CTTACCGTGCCCCCGCGGTTGAAGGGCTGGCCGAGGTGGGGCTGGGGGAACGTCTTCTCATGTCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ ID NO:48: Secuencia de aminoácidos del banco de CL

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAVAAPSVFIFPPSXXQXXXXXASVVCLLN
51 NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLLXXXXYE
101 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEEAA

- 10 SEQ ID NO:49: Secuencia de nucleótidos del banco de CL

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
51 CCAGCCGGCCATGGCCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
101 CTNNSNNSCAGNNSNNSNNSNNSNNSGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT
151 AACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCT

Figura 8 continuación

201 CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
 251 GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGTTGNNSNNSNNSNNSNNSNNS
 301 NNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNS
 351 GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGGCGGCCG
 401 CA

SEQ ID NO:54: Secuencia de aminoácidos del banco de CH

1 MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAASTKGPSVFPLAPSSXXXXXXXXXALGCL
 51 VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPXXXXXX
 101 XTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSAAA

5 SEQ ID NO:55: Secuencia de nucleótidos del banco de CH

1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGC
 51 CCAGCCGGCCATGGCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
 101 CACCCTCCTCCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGCCCCTGGGCTGCCTG
 151 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGC
 201 CCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
 251 TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCNNSNNSNNSNNSNNSNNS
 301 NNSACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA
 351 CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGCGGCCGCA