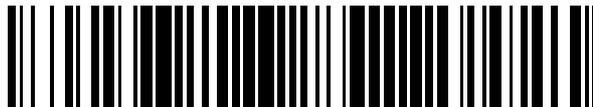


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 097**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05804791 .1**
96 Fecha de presentación: **22.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1747015**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2007**

54 Título: **Procedimiento de panning en fase en solución usando proteínas señuelo modificadas por ingeniería genética**

30 Prioridad:
26.04.2004 US 565633 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2012

73 Titular/es:
JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044 , US

72 Inventor/es:
O'NEIL, KARYN;
SWEET, RAYMOND y
HEAVNER, GEORGE

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 097 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de panning en fase en solución usando proteínas señuelo modificadas por ingeniería genética

Antecedentes de la invención**Técnica relacionada**

5 En la era postgenómica, actualmente pueden enfocarse esfuerzos en el desarrollo de fármacos sobre procedimientos de investigación para bloquear específicamente la función de proteínas clave previamente identificadas por técnicas tales como análisis en micromatrices de niveles de expresión de ARNm en patologías. La proteómica es la nueva ciencia que abarca la comprensión del modo en el que las proteínas interaccionan entre sí tanto en rutas coordinadas como compañeras de unión. La relación de la actividad estructural de las proteínas incluye el mapeo de dominios comunes y la identificación de conformaciones tridimensionales responsables de las funciones. El acceso a la información tridimensional (3D) sobre las proteínas también se ha convertido en rutina. Por ejemplo el NCBI (por las siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica) mantiene acceso público a una herramienta denominada VAST que es un servicio de búsqueda de similitud estructural-estructura. Esta herramienta compara coordenadas 3D de una estructura de proteína recientemente determinada con las que se encuentran en la base de datos de modelado molecular (BDMM) y en la base de datos de proteínas (BDP).

La tecnología de presentación de fagos describe una técnica de selección *in vitro* en la que la secuencia de polinucleótidos que codifica un péptido o una proteína está genéticamente fusionada con una proteína de cubierta de un bacteriófago, dando como resultado la presentación de la proteína fusionada en el exterior del virión del fago, mientras que el ADN que la fusión reside dentro del virión. Esta unión física entre la proteína presentada y el ADN que la codifica permite explorar un gran número de variantes de la proteína, cada una unida a su secuencia de ADN correspondiente, mediante un procedimiento de selección sencillo realizado *in vitro* denominado "bioselección".

Las bibliotecas de presentación de fagos, ribosomas, levaduras y bacterias son herramientas de consulta de grandes cantidades de proteínas o péptidos. La presentación de ribosomas es un procedimiento de traducción de los ARNm en sus proteínas afines conservando al mismo tiempo la proteína unida al ARN. La secuencia codificante de ácido nucleico se recupera por RT-PCR (Mattheakis, L. C. y col. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022). La presentación de levaduras se basa en la construcción de proteínas de fusión de los receptores de adhesión de aglutinina alfa de levadura asociados a membrana, *aga1* y *aga2*, una parte del sistema de tipo apareamiento (Broder, y col. 1997. Nature Biotechnology, 15: 553-7). La presentación de bacterias se basa en la fusión de la diana a proteínas bacterianas exportadas que se asocian con la membrana celular o con la pared celular (Chen y Georgiou. 2002. Biotechnol Bioeng, 79: 496-503).

En comparación con la tecnología del hibridoma, los procedimientos de presentación de fagos y otros anticuerpos permiten la oportunidad de manipular la selección contra el antígeno diana *in vitro* y sin la limitación de la posibilidad de incidir en huéspedes sobre el antígeno o viceversa. Una ventaja particular de los procedimientos de selección *in vitro* es la capacidad de manipular procedimientos de selección para obtener anticuerpos que se unan a diversos sitios sobre la proteína diana.

Aunque las fagotecas simplifican la recuperación de material genético asociado con atributos funcionales, se requieren estrategias de selección multietapa para aislar el mejor candidato de la fagoteca. Por otro lado, en aquellos casos en los que se conoce la información estructural en lo que respecta al dominio funcional de un ligando polipeptídico, sería deseable tener un procedimiento de selección de anticuerpos u otros compañeros de unión tales como péptidos o proteínas que se uniesen a un ligando en dominios específicos definidos. Las selecciones dirigidas a dominios o a epítomos se han convertido en un modo rutinario de selección de anticuerpos que se unen a una proteína diana. Tales selecciones se han conseguido empleando principalmente una selección de anticuerpos por etapas utilizando procedimientos diversamente conocidos como panning selectivo, panning deselectivo, captura de ligandos, panning sustractivo o selección por exploración (Hoogenboom, H. R. y col (2000) citado anteriormente).

En el panning sustractivo, para deseleccionar ligandos de unión no deseados, puede usarse una diana (o dianas) con solapamiento aunque en sitios de unión no completamente idénticos. Esta estrategia se ha usado para identificar ligandos de unión incluso a antígenos desconocidos como en el uso de células normales para deseleccionar ligandos de unión a células cancerosas. Como alternativa, se usan proteínas de origen natural con algunos dominios o estructuras comunes en la selección secuencial o competitiva para obtener anticuerpos de unión a sitios que difieren o que son comunes entre los antígenos relacionados. Típicamente, estos estudios han utilizado proteínas de origen natural tales como quimiocinas relacionadas o proteínas H-ras mutantes (Horn, I. R. y col. 1999, FEBS Lett. 463: 115-120).

El panning dirigido a la captura de ligandos es análogo a un ensayo ELISA de tipo sándwich en el que se usa un anticuerpo inmovilizado para un epítomo irrelevante y no adyacente para capturar y presentar la cara de unión preferida del ligando diana para el panning de fagos (documento US6376170). Otros investigadores han usado anticuerpos competitivos para ocultar selectivamente el antígeno en otro dominio que el dominio diana deseado (Tsui, P. y col. 2002. J. Immunol. Meth. 263: 123-132). La tecnología de exploración utiliza anticuerpos monoclonales

y policlonales, así como ligandos naturales conjugados directa o indirectamente a peroxidasa de rábano picante (HRP). En presencia de biotina-tiramina estas moléculas catalizan la biotinilación de fagos de unión en estrecha proximidad con el antígeno diana, permitiendo la recuperación específica del fago 'marcado' de la población total usando estreptavidina. De esta manera, el fago de unión a la propia diana, o en su inmediata proximidad, se recupera selectivamente (Osborn, J. K. y col. 1998. Immunotechnol. 3: 293-302). El uso de anticuerpos monoclonales para dirigir la unión en sitios alternativos también se ha denominado "epítipo caminante" (Osborn, J. K. y col. 1998. citado anteriormente). Burioni y col. 1998. Research in virology 5: 327-330, Zhou y col. 2002, PNAS. 99: 5241-5246 y Parsons y col. 1996. Prot. Eng. 9: 1043-1049 desvelan procedimientos de selección negativa.

Estos procedimientos presentan el inconveniente de que un esfuerzo total dirigido para obtener y caracterizar un compañero de unión no deseable debe preceder al esfuerzo de obtener un compañero de unión para el dominio deseado y que no esté dirigida un epítipo específico. La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para obtener anticuerpos o compañeros de unión a ligando que se unen a un epítipo seleccionado incorporando una proteína competidora híbrida en el proceso de panning.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo procedimiento para seleccionar compañeros de unión a ligando que se unen a un dominio preseleccionado usando un ligando señuelo modificado por ingeniería genética en el proceso de panning de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. El ligando señuelo se diseña para diferenciarlo de la proteína diana solo en el dominio preseleccionado que constituye el supuesto sitio de unión. El diseño de la proteína señuelo puede basarse en información estructural derivada de mediciones reales, por ejemplo datos cristalográficos por rayos X, o el diseño puede basarse en información realizada por ordenador (*in silico*), datos de estructuras tridimensionales generados por modelado informático. Cuando se dispone de información estructural, el diseño de la proteína señuelo se simplifica. Cuando, para crear un señuelo, no se dispone de información estructural o esta es incompleta, la modificación de regiones distintas de la secuencia puede basarse en variantes naturales, tales como homólogos de especies.

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos que codifican las proteínas señuelo de la invención, útiles para expresar las proteínas señuelo en una célula u organismo huésped.

Si la proteína señuelo se usa para transfectar una célula huésped, esta puede expresarse sobre la superficie de la célula o como una proteína libre secretada que puede recuperarse del medio de cultivo celular. La proteína señuelo puede purificarse o usarse en un entorno heterogéneo, tal como en una superficie de la célula. Durante la etapa de bioselección, se mantiene la proporción molar de la proteína diana y señuelo de manera que los ligandos de unión de baja afinidad y no específicos se deseleccionan y solo se recuperan los ligandos de unión para la diana. De esta manera, los compañeros de unión a proteína, fusionados a su material genético afin, se seleccionan de una biblioteca por su capacidad para unirse específicamente a la proteína diana en un sitio de unión que está modificado en la proteína señuelo y por lo tanto se sabe que interacciona con el dominio deseado.

En otro aspecto, el procedimiento de selección de anticuerpos, que se unen a un epítipo predeterminado, desvelado en el presente documento, puede usarse para transformar directamente las propiedades deseables de un anticuerpo diana o ligando de unión terapéutico, que se ha demostrado que es útil en una especie, tal como en un modelo animal, a un compuesto bioterapéutico análogo para usar eficazmente en otras especies. Como alternativa, los medicamentos biológicos humanos pueden transformarse fácilmente en análogos útiles para el tratamiento de otros mamíferos con un mecanismo de acción análogo en el género o especie animal en la que se pretende su uso, por ejemplo, en ganado vacuno, porcino, aves de corral, perros, gatos, u otros animales domésticos o importantes desde el punto de vista agrícola. En una realización de la presente invención, el proceso se usa para seleccionar anticuerpos que interaccionan con una proteína homóloga en el mismo dominio tridimensional como lo hace un anticuerpo de referencia. Esto tiene aplicaciones particulares cuando, por ejemplo, se conoce un anticuerpo monoclonal dirigido a una región particular o a un epítipo de un antígeno humano y es deseable regenerar ligandos de unión, por ejemplo anticuerpos humanos para la diana humana, para el mismo epítipo. En otra realización, el proceso es útil cuando existe un anticuerpo que se une a un epítipo de un antígeno humano y para propósitos de investigación se desean anticuerpos sustitutivos que reaccionen con el mismo epítipo en la proteína correspondiente en otra especie, tal como ratón. De esta manera, pueden obtenerse anticuerpos anti-ratón que tengan propiedades similares a las del anticuerpo anti-humano parental.

Por tanto, en un aspecto, se proporciona un procedimiento para seleccionar un compañero de unión a ligando polipeptídico bloqueante a partir de una biblioteca en la que se predetermina la región funcional específica del ligando que va a unirse, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de a) determinar el dominio funcional de la proteína que va a bloquearse b) analizar las características estructurales comunes entre el ligando y una o más especies u homólogos funcionales de este ligando, c) crear un señuelo incorporando dichas características estructurales comunes del ligando y los homólogos seleccionados en el que el señuelo tiene las características estructurales comunes en regiones distintas de las del dominio funcional que va a bloquearse y d) usar dicho señuelo en exceso del compañero de unión a ligando para seleccionar ligandos de unión que se unan con preferencia al dominio funcional que va a bloquearse. Burioni y col. 1998. Research in virology 5: 327-330, Zhou y col. 2002, PNAS. 99: 5241-5246 y Parsons y col. 1996. Prot. Eng. 9: 1043-1049 desvelan procedimientos de

selección negativa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un anticuerpo que se une a un epítipo preseleccionado de una proteína diana, que comprende (a) proporcionar una biblioteca de partículas de fago que expresen anticuerpos sobre la superficie de las partículas de fago (b) preparar una proteína señuelo que tenga cambios en las secuencias de aminoácidos correspondientes a las del epítipo preseleccionado de la proteína diana difiriendo las proteínas señuelo de la proteína diana solamente en el epítipo preseleccionado (c) incubar la biblioteca de partículas de fago con la proteína diana para seleccionar partículas de fago con anticuerpos que se unan a las partículas con la proteína diana para seleccionar partículas de fago con anticuerpos que se unan a la proteína diana (d) añadir la proteína señuelo como un competidor a una concentración de exceso molar para seleccionar negativamente partículas de fago específicas para el epítipo preseleccionado (e) separar las partículas de fago que se unen a la proteína diana de las que se unen a la proteína señuelo y (f) recuperar las partículas de fago unidas a la proteína diana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica del procedimiento de la invención.

La Figura 2 muestra las secuencias CDR y las asignaciones de armazón para los Fab que se unen al FTm (Factor Tisular murino) candidato principal.

La Figura 3 es un gráfico de la dependencia de la concentración de la unión de los Fab seleccionados por el procedimiento de la invención a la proteína diana (FTm, líneas continuas) y a la proteína señuelo modificada por ingeniería genética con dos cambios de aminoácidos en el epítipo preseleccionado (FThu/m, líneas discontinuas).

La Figura 4 es un gráfico que muestra la concentración frente a unidades de fluorescencia relativa para dos Fab seleccionados que se unen al factor tisular murino.

La Figura 5 es un alineamiento de secuencia múltiple de proteínas de IL-13 derivadas de diversas especies.

La Figura 6A y B son la energía y dimensiones de área de la hIL-4 derivadas de datos cristalográficos.

La Figura 7A y B son la energía y dimensiones de área de la hIL-13 calculadas a partir de los datos cristalográficos derivados de IL-4.

Abreviaturas

Abs anticuerpos, policlonales o monoclonales

bFGF factor de crecimiento de fibroblastos básico

GM-CSF factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

IL interleucina

Mab anticuerpo monoclonal

FT factor tisular

FIIV Factor IIV (inactivo)

FIIVa Factor IIVa (activado)

FX Factor X (inactivo)

FXa Factor Xa (activado)

Descripción detallada

Definiciones

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina o a un fragmento de unión derivado de inmunoglobulina. Aunque no todas las inmunoglobulinas se unen a antígenos, se ha observado que, fragmentos de anticuerpos pueden unirse a antígenos, polipéptidos o proteínas diana y a algunas moléculas distintas. Por tanto, como se usa en el presente documento, los "fragmentos de unión a antígeno" incluyen, pero sin limitación: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios variables (V) de una cadena pesada (H) y ligera (L) del anticuerpo junto con los dominios constantes (C) respectivos (dominios VL-CL y VH-CH1); (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E. S. y col., Nature 341: 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi)

fragmentos F(ab')₂ (vii) moléculas de Fv monocatenarias (mcFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un engarce peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno; (viii) dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos y (ix) combinaciones y proteínas de fusión que comprenden lo anteriormente mencionado, incluyendo pero sin limitación, diacuerpos, fragmentos multivalentes o multiespecíficos u otras construcciones modificadas por ingeniería genética capaces de unirse a un polipéptido diana y que comprendan un fragmento derivado de inmunoglobulina.

Una "quimera" o "proteínas quiméricas" son aquellas que contienen restos o dominios de una o más proteínas de especies homólogas. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos contienen dominios variables típicamente derivados de un mAb murino fusionado a dominios constantes de una inmunoglobulina humana.

Un "señuelo" o "proteína señuelo" es el polipéptido diseñado que incorpora un dominio preseleccionado o modificado por ingeniería genética que se usará para la selección negativa o positiva de compañeros de unión a ligando diana a partir de una biblioteca de posibles ligandos de unión diana.

Un "epítipo" se define como la región tridimensional de un ligando diana que representa la unidad de estructura unida por un solo anticuerpo. Los epítipos normalmente consisten en agrupamientos superficiales químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se diferencian porque, en presencia de disolventes desnaturizantes, se pierde la unión a los primeros pero no a los últimos. El epítipo puede encontrarse dentro o abarcar una unidad funcional previamente descrita o un dominio de proteína estructuralmente caracterizado, tal como un dominio de unión a receptor o un dominio similar a fibronectina. Por tanto, cuando un epítipo es un dominio funcional de una proteína, cuando se une mediante el compañero de unión seleccionado, da como resultado la modulación deseada de la función del ligando diana siendo dicho epítipo antagonista o agonista de la función del ligando diana.

"Sustitutivo" significa que tiene la función biológica análoga. Un anticuerpo sustitutivo realizará la función análoga, agonizará o antagonizará la actividad del ligando diana, en un contexto o en diferentes especies animales a las del anticuerpo ejemplo.

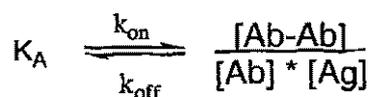
Por anticuerpo "humano" o cualquiera de cualquier otra especie, por ejemplo, anticuerpo humano, se quiere hacer referencia a incluir anticuerpos que tienen regiones variables o, variables y constantes, derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal muy parecida a la de la especie humana u otra especie. Los anticuerpos de la invención pueden incluir restos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal (tales como, pero sin limitación, mutaciones introducidas por mutagénesis *in vitro* al azar o específica de sitio o por mutación somática *in vivo*). Por tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, armazón, dominios C_L, C_H (por ejemplo C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), bisagra, (V_L, V_H)) es sustancialmente similar a un anticuerpo de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos se han clasificado en grupos en base a sus similitudes de secuencia de aminoácidos, véase, por ejemplo, <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>. Por tanto, usando una búsqueda de similitud de secuencia, como un molde para crear "anticuerpos humanos", puede seleccionarse un anticuerpo con una secuencia lineal similar. También se conocen secuencias de la línea germinal murina y pueden emplearse de una manera similar. Al igual que los datos relacionados con las inmunoglobulinas de línea germinal de otras especies se recogen y se clasifican, puede realizarse un uso similar de aquellas secuencias para la producción en anticuerpos no humanos de la invención a partir de bibliotecas de presentación de fagos u otras colecciones de fragmentos de unión a antígeno mediante métodos actualmente conocidos en la técnica.

En un aspecto, la presente invención implica el uso de bibliotecas de presentación de fagos y peptídicas combinatorias. Las bibliotecas de presentación de fagos y peptídicas combinatorias han evolucionado en técnicas poderosas y adaptables para la exploración de interacciones de péptidos y proteínas. Puede crearse una fagoteca insertando una biblioteca de oligonucleótidos al azar o una biblioteca de polinucleótidos que contenga secuencias de interés, tales como las de los linfocitos B de un animal o un ser humano inmunizado (Smith, G. P. 1985. Science 228: 1315-1317). Las fagotecas de anticuerpos contienen pares de la región variable de la cadena ligera (L, *Light*) y pesada (H, *Heavy*) en un fago lo que permite la expresión de fragmentos Fv monocatenarios o fragmentos Fab (Hoogenboom, y col. 2000. Immunol. Today 21 (8) 371-8). La diversidad de una biblioteca de fagémidos puede manipularse para aumentar y/o modificar las inmunoespecificidades de los anticuerpos monoclonales de la biblioteca para producir y posteriormente identificar otros anticuerpos monoclonales humanos, deseables. Por ejemplo, los genes que codifican la molécula de inmunoglobulina de cadena pesada (H) y cadena ligera (L) pueden mezclarse aleatoriamente (combinarse) para crear nuevos pares HL en una molécula de inmunoglobulina ensamblada. Adicionalmente, cualquiera o los dos genes que codifican la cadena H y la cadena L pueden mutagenizarse en una región determinante de la complementariedad (CDR) de la región variable del polipéptido de inmunoglobulina y posteriormente pueden explorarse con respecto a su capacidad de afinidad y de neutralización deseables. También pueden crearse sintéticamente bibliotecas de anticuerpos seleccionando una o más secuencias marco conservadas humanas e introduciendo colecciones de casetes de CDR derivadas de repertorios de anticuerpos humanos o mediante variaciones diseñadas (Kretzschmar y von Ruden 2000, Current Opinion in Biotechnology, 13: 598-602). Las posiciones de diversidad no están limitadas a las CDR sino que también pueden incluir los segmentos marco conservados de las regiones variables.

En la realización práctica de la invención otras bibliotecas útiles incluyen bibliotecas de presentación de fagos derivadas de animales no humanos o bibliotecas de anticuerpos modificados por ingeniería genética. Un ejemplo de las primeras incluye el uso de bibliotecas derivadas de inmunoglobulina de las especies de camélidos que naturalmente están desprovistas de cadenas ligeras (Hamers-Casterman y col., 1993, Nature 363: 446-448; Gahroudi y col., 1997, FEBS Lett.) y un ejemplo de las últimas incluye anticuerpos de dominio sencillo que derivan de un dominio variable de la cadena pesada o uno de la cadena ligera con capacidad de unión como se enseña en la Patente de Estados Unidos N° 6248516.

Además, en diversos esfuerzos para comprender la biología o descubrir nuevos fármacos o dianas farmacológicas, pueden combinarse distintos tipos de presentación de fagos u otros, ribosomas, levaduras, bacterias o células animales, con bibliotecas peptídicas o fagotecas de anticuerpos. Por ejemplo, para examinar fagotecas de anticuerpos, pueden usarse bibliotecas peptídicas de presentación de fagos. Usando un proceso de eliminación, puede usarse una combinación de procedimientos de presentación de fagos en sustratos y de sustracción de sustratos para descubrir diferencias de especificidad entre enzimas muy estrechamente relacionadas y esta información puede utilizarse para crear inhibidores muy selectivos (Ke, S-H, y col. 1997. J. Biol. Chem. 272 (26): 16603-16609).

La unión entre ligandos y receptores como antígenos y anticuerpos, es dependiente de enlaces de hidrógeno, enlaces hidrófobos, fuerzas electrostáticas y fuerzas de van der Waals. Todos ellos son enlaces de una naturaleza débil, no covalente, sin embargo, la asociación entre antígeno y anticuerpo se sabe que es una de las más fuertes encontradas en la naturaleza. Al igual que los anticuerpos, los antígenos pueden ser multivalentes, a través de copias múltiples del mismo epítipo o a través de la presencia de epítipos múltiples que reconocen anticuerpos múltiples. Las interacciones que implican multivalencia pueden producir complejos más estabilizados, sin embargo la multivalencia también puede dar como resultado dificultades estéricas, reduciendo así la posibilidad para la unión. Toda unión antígeno-anticuerpo es reversible, sin embargo, y siguiendo los principios termodinámicos básicos de cualquier interacción biomolecular reversible:



En la que K_A es la constante de afinidad, Ab y Ag son las concentraciones molares de sitios de unión no ocupados en el anticuerpo o antígeno respectivamente, y $Ab-Ag$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno. La reacción hacia adelante se conoce como "asociación" y la disolución o reacción hacia atrás se conoce como "disociación".

Para que se produzca una interacción eficaz entre el antígeno y el anticuerpo, el epítipo debe estar fácilmente disponible para la unión. Dado que las moléculas de antígeno se encuentran en espacios, el epítipo reconocido por un anticuerpo puede ser dependiente de la presencia de una conformación antigénica tridimensional específica (por ejemplo, un sitio único formado por la interacción de dos subunidades de proteínas naturales), o el epítipo puede corresponder a una región de secuencia primaria simple. Tales epítipos se describen como "conformacionales" y "lineales", respectivamente.

Procedimiento de la invención

Se ha diseñado un procedimiento para aislar anticuerpos u otros ligandos de unión que se unen a un epítipo predeterminado por selección dirigida de anticuerpos que presentan de fagos usando una proteína competidora modificada por ingeniería genética (Fig. 1). El procedimiento depende de información estructural sobre la proteína diana que se aplica al diseño de una proteína señuelo apropiada. Esta proteína señuelo se usa como un competidor en la presentación de fagos de anticuerpos para aislar los anticuerpos específicos de epítipo deseados (Fig. 1).

La especificidad de unión de los anticuerpos generados por el procedimiento tradicional de inmunización de animales se estimula por una combinación del sistema inmunitario del animal y el antígeno de proteína. Por tanto, los anticuerpos derivados de inmunización a menudo interaccionan con epítipos "inmunodominantes" que son diferentes de los epítipos diana deseados. Los procedimientos de selección de anticuerpos existentes que usan bibliotecas de anticuerpos de presentación de fagos no pueden dirigirse con precisión al epítipo de interés. El procedimiento descrito tiene la ventaja de permitir una dirección muy precisa y eficaz de la selección contra anticuerpos específicos para el epítipo diana.

El procedimiento de selección de anticuerpos que se unen a un epítipo predeterminado puede usarse para transformar directamente las propiedades deseables de un anticuerpo diana o ligando de unión terapéutico (biotrapéutico), que se ha demostrado que es útil en una especie, tal como en un modelo animal, en un compuesto biotrapéutico análogo para usar eficazmente en otras especies. Como alternativa, los medicamentos biológicos humanos pueden transformarse fácilmente en análogos útiles para el tratamiento de otros mamíferos, por ejemplo, en ganado vacuno, porcino, aves de corral, perros, gatos, u otros animales domésticos o importantes desde el punto

de vista agrícola o animales poco comunes o especies en vías de extinción.

Entre las 15 patologías más comunes que afectan a los animales de compañía (perros, gatos y caballos) muchas son hormonales: diabetes melitus en caninos y felinos, trastornos tiroideos en caninos y felinos, hipotiroidismo en caninos, hipertiroidismo en felinos, enfermedad de Addison y enfermedad de Cushing en caninos. Otras enfermedades comunes que afectan a los animales de compañía y a otros animales incluyen osteoartritis y diversas formas de cáncer. Por tanto, existe la posibilidad de terapias biológicas humanas acertadas, tales como terapias con anticuerpos contra el cáncer y antiinflamatorias, para transformarlas a otras especies análogas específicas. Por ejemplo, usando los procedimientos de la invención, el fármaco REMICADE (infiximab) que se une a un solo epítipo en el TNFalfa human, podría transformarse en un fármaco terapéuticamente eficaz para su uso en el tratamiento de animales de compañía para trastornos mediados por TNFalfa comunes a esas especies de animales.

Selección del sitio de unión diana

Cada célula linfocítica produce anticuerpos que son específicos no para un antígeno, sino para un epítipo. Mientras que un antígeno es parte de una célula, partícula, proteína o molécula extraña que reconoce el sistema inmunitario y se dirige por anticuerpos y/o linfocitos T citotóxicos, un epítipo es el sitio de unión correspondiente a un determinante antigénico sobre una proteína. Los polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y muchos otros materiales también pueden actuar como antígenos. También pueden generarse respuestas inmunitarias contra sustancias más pequeñas, denominadas "haptenos", si estas se acoplan químicamente a una "proteína transportadora" más grande, tal como albúmina de suero bovina o hemocianina u otras matrices sintéticas. Los haptenos pueden ser una diversidad de moléculas tales como fármacos, azúcares simples, aminoácidos, péptidos pequeños, fosfolípidos o triglicéridos. Los antígenos que suscitan fuertes respuestas inmunitarias se dice que son "fuertemente inmunogénicos". Empíricamente se ha determinado que un determinante antigénico, el cual suscitará una respuesta inmunitaria clonal, puede tener tan solo de 1 a 8 aminoácidos o de 1 a 6 monosacáridos. Desde un punto de vista operativo el epítipo reconocido por la inmunoglobulina derivada de un clon (un anticuerpo monoclonal) puede abarcar una secuencia más grande y no contigua sobre la superficie de una proteína.

Cuando un epítipo se encuentra dentro de una región funcional de una proteína, el efecto de la unión de los anticuerpos con esa proteína será neutralizar la función de la proteína conferida por esa característica estructural de la misma. Este concepto se ha demostrado ser la base de los anticuerpos monoclonales terapéuticos. Por lo tanto, la capacidad de seleccionar de manera reproducible anticuerpos u otros ligandos de unión para un epítipo o dominio de proteína específico representaría un avance en la técnica del desarrollo terapéutico de proteínas.

El mapeo epitópico de anticuerpos es una forma en la que pueden identificarse dominios funcionales. El mapeo epitópico puede realizarse con alta o baja resolución dependiendo del objetivo. El mapeo de baja resolución implica exponer una serie de anticuerpos monoclonales a secuencias sobre la superficie de una proteína natural. Lo importante es cubrir toda la superficie de la diana e identificar que secuencias son importantes para funcionar. A diferencia de los candidatos principales de mAb, los anticuerpos usados en el mapeo epitópico pueden ser de baja afinidad, deben incluir mAb neutralizantes y no neutralizantes, y, en este procedimiento, la determinación del epítipo exacto no es normalmente necesaria. Una vez identificado el epítipo con una resolución particular deseada, pueden usarse ensayos competitivos con el anticuerpo que produce el efecto deseado, normalmente neutralización de la función, para identificar otros ligandos de unión en esa región, por ejemplo, anticuerpos humanos que pueden competir con un anticuerpo murino por una proteína diana humana.

Para identificar epítipos de otras formas pueden usarse conjuntos de anticuerpos que se unen a una proteína diana. Por ejemplo, el antígeno puede digerirse con proteasas y la unión de los fragmentos resultantes con el anticuerpo determinarse en un formato ELISA o por espectroscopia de masas. El complejo antígeno-anticuerpo puede digerirse con proteasas y los fragmentos proteolíticos identificarse por espectroscopia de masas. En este caso, la ocultación de sitios proteolíticos por el anticuerpo identifica el epítipo.

Existen otros procedimientos que se han usado para identificar el epítipo de un anticuerpo. Pueden sintetizarse péptidos que correspondan a fragmentos solapantes de toda la secuencia de un antígeno y la unión del anticuerpo a estos péptidos puede determinarse en un formato ELISA o usando espectroscopia por resonancia de plasmón superficial. Pueden usarse estudios de RMN utilizando antígenos marcados isotópicamente para identificar qué aminoácidos tienen cambios en su medio magnético tras la unión al anticuerpo. Otra técnica es la medición de la temperatura de transición de fusión térmica. La estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo puede determinarse y usarse para identificar el epítipo. De estos procedimientos, la cristalografía es el más definitivo seguido de estudios de RMN.

Un formato ELISA utiliza etapas de lavado para eliminar materiales no unidos antes de la detección. En el caso en el que el epítipo sea lineal (el anticuerpo solo reconoce una secuencia lineal sencilla de aminoácidos) la afinidad del anticuerpo por un fragmento peptídico que contiene el epítipo puede ser suficientemente alta para detectar la unión. Cuando el epítipo es conformacional que consiste en dos o más secuencias de aminoácidos no contiguas dentro de la proteína, la afinidad de cada secuencia individual por el anticuerpo puede ser baja y no detectarse. Usando espectroscopia por resonancia de plasmón superficial, la unión a los péptidos que definen un epítipo conformacional puede no detectarse ya que la afinidad por cada péptido del epítipo puede ser baja. Si la disociación del péptido es

alta, la unión no puede detectarse.

Los epítomos también pueden identificarse en las proteínas usando resonancia magnética nuclear (RMN). Los solicitantes de las solicitudes en trámite junto con la presente (U.S. Ser. Nº 10/393926) enseñan una técnica que identifica átomos específicos (generalmente H¹, C¹³ y N¹⁵), y por tanto restos aminoácidos, basados en su entorno local. La asignación completa de la mayoría o de todas las resonancias puede realizarse para proteínas grandes proporcionando tiempo suficiente e instrumentos de resolución suficientemente alta. Este procedimiento se basa en la observación de que cuando un anticuerpo se une a un antígeno, el entorno local de algunos aminoácidos cambia. Aquellos aminoácidos que pueden someterse a los cambios más grandes son aquellos más implicados con el contacto con el anticuerpo. Teóricamente es posible identificar un epítopo realizando todas las asignaciones de RMN, tanto para el antígeno como para el anticuerpo en estado unido y no unido y determinar qué aminoácidos tienen átomos desplazados. La complejidad del espectro de RMN de un complejo antígeno-anticuerpo hace que tal análisis sea extremadamente difícil y no sea aplicable a la identificación epitópica rutinaria. Sin embargo, el procedimiento de los solicitantes identifica epítomos de proteína usando proteínas enriquecidas en aminoácidos marcados con C13 o N15 en el que no siempre se requiere la identificación exacta de las señales por RMN. El marcaje múltiple de dos o más aminoácidos diferentes en la misma proteína puede usarse cuando las resonancias para los diferentes aminoácidos son lo suficientemente diferentes. Por ejemplo, en una proteína pueden incorporarse alfa-N15 alanina y épsilon-N15 lisina así como épsilon-N15 histidina y alfa-N15 leucina. Los epítomos pueden ser las regiones de unión de anticuerpos o de ligandos. Además, la modelación molecular o algoritmos que predicen secuencias expuestas en la superficie en proteínas puede ayuda en la identificación de epítomos.

Un epítopo también puede diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos primaria de la diana en ausencia de mediciones físicas de la estructura diana. Por ejemplo, en proteínas de aproximadamente 5-10 restos aminoácidos puede modificarse un segmento lineal de aproximadamente 5-15 de la proteína para crear una proteína señuelo variante o una diana quimérica y medirse la unión para determinar el epítopo.

La homología entre proteínas se basa en la similitud en secuencias base de genes o secuencias de aminoácidos de proteínas que indica un origen evolutivo común. Generalmente, habrá una similitud de estructura o función de proteínas que se deba a un origen evolutivo común. Este no es siempre el caso y la evolución divergente y la mutación pueden conducir a proteínas que tengan similitudes estructurales pero funciones divergentes o funciones convergentes a partir de estructuras diferentes; ortólogos y parálogos, respectivamente. La mutagénesis de barrido homólogo es una estrategia bien conocida para la identificación de regiones de unión a receptores de una proteína por sustitución de regiones análogas de proteínas homólogas para conservar la estructura tridimensional natural de la proteína original; por ejemplo, la sustitución de regiones de la hormona del crecimiento humano con regiones de la hormona del crecimiento porcino, prolactina humana o lactógeno placentario humano, seguido de la determinación de las constantes de unión para las construcciones. Estas variantes estructurales naturales pueden usarse para determinar dominios o epítomos dentro de los dominios útiles en la construcción de la proteína señuelo apropiada de la invención.

Construcción del señuelo

Una "proteína señuelo" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína que difiere en una o más características estructurales de una proteína diana en el dominio específico que abarca el sitio o la región funcional para unirse. Por lo tanto, el señuelo puede ser una proteína diana quimérica o el señuelo puede ser una proteína de origen natural, tal como una especie homóloga y el ligando diana puede ser la secuencia modificada por ingeniería genética que incluye el dominio de unión preseleccionado. En el proceso de la invención, el señuelo se une a ligandos de unión de baja afinidad y no específicos y, por lo tanto se seleccionan aquellos ligandos de unión que forman complejo con la diana que está retenida. En un aspecto, el homólogo estructural adecuado que puede servir como un almacén para aceptar el epítopo diana puede ser un ortólogo de la proteína diana. Un homólogo estructural también puede ser otro miembro de una familia de multigenes.

Con la evolución y almacenamiento de grandes cantidades de información estructural 3-dimensional procedente de cristalografía por rayos X, RMN y otras técnicas, puede recogerse fácilmente información sobre la estructura de las proteínas o puede generarse información estructural virtual de diversas maneras. El Centro de Investigación Bioinformática de la Universidad de Glasgow proporciona acceso a un sitio Internet para describir y comparar estructuras de proteína usando el programa informático Topología de la Estructura de Proteínas (TOPS) (TP Flores, DS Moss y JM Thornton. 1994. Protein Engineering, 7: 31-37). Al servidor pueden enviarse coordenadas de la proteína en forma de archivos de tipo PDB. La estructura se convierte en una representación animada simplificada, denominada representación TOPS, y después se compara frente a un subconjunto no redundante de todas las estructuras conocidas. Los resultados vuelven a introducirse como un listado clasificado, mostrando el valor de compactación, la identificación registrada de las estructuras y el modelo normal usando un valor de 1 para un par de estructuras idénticas y de 0 para dos estructuras sin características comunes.

El MASS (Alineamiento Múltiple por Estructuras Secundarias) se basa en un alineamiento en dos niveles, usando tanto estructura secundaria como representación atómica. El razonamiento que respalda esta estrategia es que las proteínas están intrínsecamente compuestas por elementos de estructura secundaria (ESS). Estas son las regiones dentro de una proteína que proporcionan la estabilización de su almacén, sobre el cual se injertan los sitios

funcionales. Por consiguiente, los ESS están evolutivamente muy conservados mientras que se producen frecuentemente mutaciones en bucles flexibles, que son más difíciles de alinear. El MASS, es un procedimiento muy eficaz para el alineamiento estructural de moléculas de proteína múltiples y para la detección de motivos estructurales comunes. La utilización de información de estructura secundaria ayuda a ignorar soluciones de interferencia y consigue eficacia y fuerza. La ventaja del MASS es que es independiente del orden de secuencia y es por tanto capaz de detectar motivos estructurales no topológicos en alineamientos o subconjuntos múltiples. Usando MASS, puede guiarse el acoplamiento proteína-proteína, que es un problema notoriamente difícil. MASS se encuentra disponible en <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/MASS/>. (Dror, O. y col. *Protein Science* (2003), 12: 2492-250).

La presente invención emplea el procedimiento de combinar información estructural con grandes bibliotecas de sistemas de expresión que codifican proteínas-ácidos nucleicos que permiten la selección de anticuerpos para un epítipo único. Como un ejemplo, se identificó un epítipo complejo y específico en el homólogo murino del factor tisular ("FT") humano. Los anticuerpos existentes en la técnica no inhiben la función del FTm (Factor Tisular murino) o no son inhibidores competitivos específicos de la unión del Factor X al FT. Los anticuerpos descritos tienen estas funciones y por lo tanto representan herramientas anteriormente no disponibles para evaluar el potencial terapéutico para anticuerpos anti-FT que neutralizan la actividad del FT inhibiendo la activación del FX. Además, estos anticuerpos son reactivos valiosos para analizar la función del FT en procesos del desarrollo, neoplásicos, angiogénicos, inflamatorios y trombóticos normales y patogénicos.

Aislamiento de anticuerpos u otros ligandos de unión dirigidos a epítopos

Para aislar anticuerpos u otros ligandos de unión dirigidos a epítopos existen tres estrategias generales de acuerdo con la invención: (1) selección competitiva usando bibliotecas de presentación de anticuerpos u otros ligandos de unión posibles; (2) selección no competitiva usando bibliotecas de presentación seguida de exploración con respecto a la actividad de unión diferencial y (3) inmunización de animales seguida de exploración con respecto a la actividad de unión diferencial.

En la selección competitiva usando proteínas señuelo, la biblioteca de presentación se selecciona para unirse a una proteína diana en presencia de la proteína señuelo que está en exceso molar sobre la proteína diana. La selectividad de los anticuerpos o ligandos de unión recuperados se confirma explorando los anticuerpos o ligandos de unión aislados para la unión con la proteína diana y no con la proteína señuelo.

Por tanto, en un ejemplo de este procedimiento, se proporciona un procedimiento para identificar un polipéptido que se una a un epítipo preseleccionado de una proteína diana, que comprende (a) proporcionar una biblioteca de partículas de fago que expresen polipéptidos en la superficie de las partículas de fago, (b) preparar una proteína señuelo que tenga cambios en las secuencias de aminoácidos correspondientes al epítipo preseleccionado de la proteína diana (c) incubar la biblioteca de partículas de fago con la proteína diana para seleccionar partículas de fago con polipéptidos que se unen a la proteína diana (d) añadir la proteína señuelo como un competidor en una concentración en exceso molar para seleccionar negativamente las partículas de fago específicas para el epítipo preseleccionado (e) separar las partículas de fago que se unen a la proteína diana de las que se unen a la proteína señuelo y (f) recuperar las partículas de fago unidas a la proteína diana y no a la proteína señuelo.

Menos preferido es el uso de la proteína natural como el "señuelo" para seleccionar con respecto a la unión a la proteína quimérica o mutante. En este caso, la proteína que contiene la proteína armazón original se usa en exceso molar sobre la proteína quimérica o mutante. La selectividad de los anticuerpos o ligandos de unión recuperados se confirma explorando los anticuerpos o ligandos de unión aislados con respecto a la unión a las proteínas diana señuelo y a las proteínas diana y no a la proteína armazón.

En una selección de dos etapas con una proteína señuelo, la biblioteca de presentación se selecciona frente a la proteína diana. Los anticuerpos u otros ligandos de unión recuperados se exploran después (normalmente de manera individual) con respecto a la unión selectiva a la proteína diana y no a la proteína señuelo.

Para la estrategia de inmunización usando la proteína señuelo, a especies animales adecuadas para el aislamiento de hibridomas estables que producen anticuerpos monoclonales se las inmuniza con la proteína diana. Los hibridomas se generan y exploran para determinar la expresión de un anticuerpo que se una al antígeno diana pero no que se una a la proteína señuelo. La estrategia de inmunización puede combinarse con cualquiera de las estrategias de presentación anteriores. Por tanto, el ARNm de las células inmunitarias (por ejemplo linfocitos de bazo o de sangre periférica) se usa para generar una biblioteca de anticuerpos que después se procesa como se describe mediante cualquier estrategia de presentación. Esta estrategia no se limita a animales adecuados para aislamiento de hibridomas estables.

Puede diseñarse bibliotecas peptídicas de acuerdo con los procedimientos descritos con detalle en el presente documento y con los procedimientos generalmente disponibles que se encuentran en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.723.286 presentada el 3 de marzo de 1998 por Dower y col.). En un aspecto pueden usarse bibliotecas de presentación de fagos disponibles en el mercado (por ejemplo, RAPIDLIB' o GRABLIB', DGI BioTechnologies, Inc., Edison, NJ; Ph. D. C7C Disulfide Constrained Peptide Library, New England Biolabs).

Las bibliotecas de anticuerpo se encuentran disponibles, por ejemplo, en Cambridge Antibody Technology, Morphosys, Affymax Research Institute, Palo Alto, CA. Se han diseñado diversas estrategias para seleccionar un subconjunto de ligandos de unión viable para análisis y maduración por afinidad posterior. Estas incluyen: el bloqueo de epítomos inmunodominantes por desección competitiva, el rescate de una gama más amplia de especificidades de anticuerpos usando una estrategia de ocultación de epítomos, la exploración por ascenso de captura, la selección guiada de anticuerpos usando ELISA de captura de tipo sándwich, la selección de anticuerpos por guías de proximidad (ProxiMol), el aislamiento de anticuerpos monoclonales usando selección guiada con anticuerpos monoclonales de ratón, la selección de anticuerpos contra antígenos de la superficie celular usando técnicas de separación magnéticas, el aislamiento de antígenos de la superficie celular asociados a tumores humanos que se unen a los mFv (Fv monocatenarios), el aislamiento sustractivo de anticuerpos monocatenarios usando fragmentos tisulares, la selección de anticuerpos basada en las propiedades de la cinética de unión a anticuerpos, la selección de anticuerpos funcionales en base a la valencia (Antibody Phage Display. *Methods and Protocols*. En: David W. J. Coomber, Ed. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Vol. 178, diciembre 2001 páginas 133-145).

El enriquecimiento por afinidad de fagos se basa en tasas de disociación bajas de los ligandos de unión diana. Una tasa de disociación baja es normalmente predictiva de alta afinidad. En estos ejemplos de enriquecimiento por afinidad, la incubación continuada del fago diana y del fago ligando de unión diana se realiza en presencia de una cantidad saturante de un ligando de unión diana conocido o aumentando el volumen de la solución de incubación. En cada caso, se impide que el fago ligando de unión diana disociado vuelva a unirse y aumentando el tiempo, se recuperan los fagos ligando de unión diana de mayor afinidad.

Para cada ligando de unión diana de interés se optimizan el tiempo de preincubación y las condiciones de preincubación. Para controlar el efecto de las diversas concentraciones sobre el enriquecimiento por afinidad se realizaron experimentos piloto de selección. Después de incubar la diana y el fago ligando de unión diana y la transformación de las células huésped, las células huésped se sembraron en placa sobre medios selectivos y se cuantificó. La determinación del cambio en el número de colonias que sobreviven proporciona una herramienta de valoración sencilla para determinar el grado de enriquecimiento por afinidad. A medida que desciende el número de colonias supervivientes, el número de ligandos de unión débiles supervivientes disminuye significativamente, quedando menos ligandos de unión diana con mayor afinidad. Por ejemplo, la pérdida del número de colonias supervivientes, hasta solo 1%, 0,1% o 0,001% de supervivencia, indica condiciones óptimas para enriquecer ligandos de unión diana que se unen a la diana que tiene mayor afinidad. En algunas circunstancias, el número de de colonias supervivientes podría limitarse a aproximadamente 100 colonias para análisis por secuenciación.

Dependiendo de la diversidad del tipo de biblioteca de ligando de unión diana usado, el número de ligandos de unión diana con una mayor afinidad puede ser menor de 10.

El uso de las técnicas de enriquecimiento por afinidad anteriores permite el enriquecimiento sin realizar necesariamente rondas de selección adicionales. Las técnicas de enriquecimiento por afinidad pueden usarse en solitario o en combinación. Debe entenderse que, si se desea, la presente invención también podría usar rondas de selección múltiples para proporcionar enriquecimiento por afinidad.

Citas: Todas las publicaciones o patentes citadas en el presente documento muestran el estado de la técnica: Ausubel, y col., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004); Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, *Antibodies*, a *Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, y col., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2004); Colligan y col., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004).

Habiéndose descrito la invención en términos generales, las realizaciones de la invención se desvelarán adicionalmente en los siguientes ejemplos.

45 **Ejemplo 1:**

Diseño y producción de la proteína quimérica del factor tisular humano/murino

El Mab TF8-5G9 diseñado reconoce y se une al Factor Tisular humano e impide la asociación del Factor X con el FT o el complejo FT/Factor VIIa (Ruf, W. y Edgington, T. S. 1991. *Thromb. Haemost.* 66: 529-539). En base al análisis de la estructura cristalina del Fab de TF8-5G9 formando complejo con el FT humano, todos los restos que forman el epítipo reconocido por el Fab se encuentran entre los restos 149 y 204 del FT humano. Se sabe que esta región de la proteína también desempeña una función importante en la interacción del FT con el dominio de Gla del FX (Ruf y col 1992). Quince restos específicos entre 149 y 204 del FThu se localizan apropiadamente para aportar contribuciones energéticas significativas a la unión (Huang, y col. *J. Mol. Biol.* 275, 873-894). Como se ilustra en el alineamiento de secuencias más adelante, cuando las secuencias del dominio extracelular del FT humano (Nº de Acceso a GenPept NP_001984) y murino (Nº de Acceso a GenPept NP_034301) se alinean entre los restos 149 y 204 del dominio EC humano y 152-207 del dominio EC murino, siete de los quince restos significativos son idénticos (restos humanos K149, K165, K166, T167, T170, N171, Q190) mientras que ocho de los quince restos son diferentes (restos humanos sustituidos por: Y156T, K169I, V192M, P194F, V198T, R200Q, K201N y D204G). Los

restos en negrita representan restos que contribuyen significativamente a la estabilización del complejo TF8-5G9:FTh. Estos restos tienen una energía de unión libre delta de 1-4 kcal/mol o mayor.

Ser humano

¹⁴⁹**KDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFVQAVIPSRVTNRKSTD**₂₀₄

5 **Ratón**

¹⁵²**KDLGYIITYRKGSSTGKKTNITNTNERSIDVEEGVSYCFFVQAMIFSRKTNQNSPG**₂₀₇

De acuerdo con este análisis, podría construirse una proteína señuelo de proteína quimérica a partir de la secuencia codificante del Factor Tisular murino realizando mutaciones de los restos de contacto únicos de TF8-5G9 sobre el FTm para corresponderse con el resto encontrado en el FTh en la posición de acuerdo con el alineamiento. Aunque existen otras posiciones en las que hay diferencias de restos de aminoácidos entre el factor tisular murino y humano, se supuso que estas no contribuían a la función global o estructura de la proteína en cuanto al epítipo identificado. Usando como molde el gen del FTm, se construyó una proteína quimérica que tenía mutaciones de los ocho restos de contacto únicos de TF8-5G9 sobre el FTm para el resto correspondiente encontrado en el FTh (SEC ID Nº 1). La región transmembrana se suprimió de manera que solamente se expresó el dominio extracelular soluble del FT y para simplificar la purificación se añadió un marcador carboxilo terminal de His. El FT murino soluble y la proteína quimérica se expresaron y se purificaron a partir de células HEK 293E. La proteína purificada se analizó por SDS-PAGE para mostrar el PM esperado para el FT Hu/m (Factor Tisular humano/murino) (40 kDa) y para el FTm (Factor Tisular murino) (35 kDa).

La solución basada en panning con la biblioteca de presentación de fagos HuCAL (Morphosis, Martinsreid, Alemania) se consiguió usando la proteína FTm biotinilada. Como señuelo se añadió proteína quimérica FTh/m a una concentración en exceso molar de diez veces para deseleccionar fagos específicos para todos los epítipos excepto para el epítipo identificado en FTm. La unión del fago al FTm biotinilado se recuperó por captura sobre perlas magnéticas revestidas con estreptavidina. Todos los ligandos de unión se secuenciaron dando veintitrés Fab únicos a partir de esta selección: a la concentración ensayada, solo 9 reconocieron el FTm, con preferencia 3 reconocieron el FTm sobre el FTh/m, y 11 reconocieron las dos proteínas de manera similar (Tabla 1).

Se realizó un panning sobre el FTm sin la proteína quimérica competitiva para verificar que los Fab seleccionados eran el resultado de la selección dirigida de epítipo y no una zona caliente sobre el FTm. Las condiciones de panning fueron idénticas entre los dos experimentos excepto por la omisión del antígeno competitivo en el proceso de selección. Todos los ligandos de unión se secuenciaron para producir siete Fab únicos. Solo uno de los Fab aislados en la selección sin competidor se unió específicamente al FTm lo que sugiere que la adición del antígeno competitivo permitió la selección de los Fab que reconocían específicamente a la proteína FTm y no a la proteína FTh/m con cambios en el epítipo TF8-5G9 (Tabla 1).

TABLA 1.

Experimento de panning	Unión de clones Fab		
	FTm >> FTh/m	FTm > FTh/m	FTm = FTh/m
Competición (FTm/h = 10X FTm)	9/23	3/23	11/23
Solo FTm	1/7	2/7	4/7

Los Fab humanos específicos anti-FT murino se purificaron por cromatografía de afinidad y se evaluaron mediante ensayo ELISA con respecto a la unión a FTm o FTh/m. Las secuencias CDR para estos Fab se indica en la Fig.2, las asignaciones de las secuencias marco conservadas se realizaron por comparación con manual HuCAL de Morphosys. Las secuencias marco conservadas se indican en la parte inferior de la Figura 2. Los nueve Fab específicos del FTm demostraron unión, dependiente de la dosis, al FTm con una reactividad cruzada mínima para el FTh/m (Figura 3). En el formato Fab, PHD127 tuvo la mayor afinidad de unión por el FTm en este formato mientras que PHD103 tuvo la menor afinidad. Se seleccionaron cinco Fab (PHD 103, 104, 126, 127 y 130) para conversión en inmunoglobulinas de longitud completa en base a su afinidad por el FTm. En la Figura 2 se muestran las regiones variables para los cinco Fab (PHD 103, 104, 126, 127 y 130) y las SEC ID Nº: 2-11 se clonaron en vectores para la expresión de moléculas de mlgG2a en células HEK 293.

Inhibición de coagulación

Los Fabs sustitutivos anti-FTm seleccionados se evaluaron con respecto a su capacidad para inhibir la coagulación en plasma humano usando, como fuente de FTm (Factor Tisular murino), extractos de cerebro murino. Basándose en experimentos previos, se esperaba que los Fab que se unían al epítipo TF8-5G9 en el FTm interrumpiesen la ruta de coagulación y retrasasen la formación de coágulos. En este ensayo, se midió la inhibición de la formación de coágulos de fibrina en plasma humano. Cuatro de los cinco Fab sometidos a ensayo retrasaron o inhibieron *in vitro* la coagulación en plasma humano: PHD 103, PHD 104, PHD 126 y PHD 127. PHD126 y PHD 127 fueron significativamente más fuertes inhibiendo la coagulación en plasma humano. Basándose en el ajuste de la curva para el tiempo de coagulación frente a la concentración de Fab los valores CE50 medibles variaron de 0,2 µg/ml a

63 µg/ml.

Fab	Conc. (µg/ml) CE50
PHD102	>200
PHD103	63.3
PHD104	23.8
PHD109	>200
PHD126	0.23
PHD127	0.82
PHD128	> 200
PHD129	> 200

Inhibición del Factor X

5 La inhibición del Factor X se midió mediante los Fab anti-FTm que inhibieron la coagulación (PHD 103, 104, 126, 127) en presencia de extractos de cerebro murino (como fuente de factor tisular). Los extractos se incubaron con FVIIa y se añadieron los Mab sustitutivos anti-FTm en presencia del FX y se midió la inhibición de la conversión del FX al FXa. Los Fab PHD 103, 126 y 127 inhibieron la activación del Factor X (escisión) al Factor Xa. La inhibición de la activación del Factor X se volvió a evaluar posteriormente usando las IgG anti-FTm de longitud completa. Se observó buena inhibición para PHD 103, 126 y 127, mientras que no se observó inhibición con PHD 104.

Análisis por FACS (Separación de Células Activadas por Fluorescencia)

10 Como anticuerpos candidatos atractivos más activos, se evaluaron PHD126 y PHD127 con respecto a su capacidad para unirse a células de melanoma B6F10 que expresaban el FTm a altos niveles. PHD126 y PHD127 se unieron al FTm asociado a las células de una manera dependiente de la dosis con un valor CE50 de 37,8 nM o 4,35 µM respectivamente (Figura 4). Las secuencias de la región variable completa para las cadenas pesadas y ligeras de PHD 126 y 127 como se muestra en la figura 2 mediante componentes de subdominio individuales se incluyen como las SEC ID N°: 6-9 como se indica.

Sumario

20 Los experimentos descritos en el presente documento demuestran que la selección de anticuerpos de presentación de fagos dirigida por epítipo usando una proteína competidora modificada por ingeniería genética es un proceso viable. El procedimiento se basa en información estructural sobre la proteína diana para permitir el diseño de un competidor apropiado. Además, este procedimiento permite la selección de anticuerpos reactivos contra epítopos específicos sobre una proteína de interés. Los procedimientos existentes de selección de anticuerpos usando bibliotecas de anticuerpos de presentación de fagos no pueden dirigirse exactamente al epítipo de interés. El procedimiento descrito tiene la ventaja de permitir una dirección muy precisa y eficaz de la selección contra anticuerpos específicos para el epítipo identificado. Se ha empleado este procedimiento para permitir la selección de anticuerpos contra un epítipo único en el Factor Tisular murino, FTm.

25 El FT es una molécula compleja que actúa como un receptor y como un ligando, siendo capaz de formar un complejo único con el FVIIa y el FX. Por tanto, los Mab que impiden esta interacción deben dirigirse a una región única de la molécula. Los anticuerpos existentes en la técnica no inhiben la función del FTm o no son inhibidores competitivos específicos de la unión del Factor X al FT. Los anticuerpos desvelados tienen estas funciones y por lo tanto representan herramientas anteriormente no disponibles para evaluar el potencial terapéutico para anticuerpos anti-FT que neutralizan la actividad del FT inhibiendo la activación del FX. Además, estos anticuerpos son reactivos valiosos para analizar la función del FT en procesos del desarrollo, neoplásicos, angiogénicos, inflamatorios y trombóticos normales y patogénicos.

35 Ejemplo 2: Construcción de una proteína señuelo química para la selección de ligandos de unión a un dominio común capaz de activar diferentes subunidades de receptores

40 La interleucina-13 (IL-13) es una citocina que se encuentra a niveles elevados en las vías respiratorias de pacientes con asma. La IL-13 se produce por linfocitos T CD4⁺ activados y desempeña una función importante en la proliferación de linfocitos B y en la producción de IgE, hiperplasia de células caliciformes e hipersecreción mucosa, inflamación eosinófila e hipersensibilidad de las vías respiratorias observada en pacientes asmáticos. Se ha observado que la sobreexpresión de IL-13 en ratones transgénicos confiere un fenotipo similar al asmático mientras que se ha demostrado que la neutralización de IL-13 usando antagonistas atenúa la respuesta asmática.

La IL-13 se une a al menos dos receptores, uno que puede encontrarse en la mayoría de los tipos de células excepto en linfocitos T y el otro que puede actuar como un receptor señuelo. El receptor que se ha implicado en las respuestas proinflamatorias se comparte con el receptor para IL4 y está comprendido por dos subunidades,

IL4Ralfa1 e IL13Rbeta1. La IL-13 es un miembro de la familia de citocinas de cadena corta que incluye la IL-4, IL-2, IL-3 y el GM-CSF. Estas proteínas adoptan una topología en haz de cuatro hélices e incluye dos o tres enlaces disulfuro. Se ha determinado una estructura en solución para la IL-3 que verifica su similitud con otras proteínas en esta familia (Eisenmesser, E. Z., y col. J. Mol. Biol. (2001) 310: 231-241; Moy, F. J., y col., J. Mol. Biol. (2001) 310: 219-230). Aunque la IL-13 solo comparte una identidad de secuencia de 25% con la IL-4, las estructuras globales son muy similares y se espera que la interacción de IL-13 con su receptor sea similar a la recientemente determinada para la IL-4 y su receptor. De hecho, dado que las dos citocinas comparten una subunidad en sus receptores, es probable que IL-13 e IL-4 compartan similitudes estructurales en sus interacciones con la subunidad IL4R α 1. La estructura tridimensional de IL-13 considerada en su conjunto con estudios mutacionales indica que hay dos caras de la citocina que desempeñan una función importante en la interacción con su receptor. El modelo sugiere que la cara de la proteína que comprende las hélices A y B interacciona con la subunidad IL-4Ralfa1 del receptor y la interfaz de la hélice A a la hélice D interacciona con la subunidad de IL13Ralfa1.

En base a la estructura de la IL-13 y en el modelo de interacción del receptor, se espera que un anticuerpo que bloquea la interacción de las hélices A y D con ILRalfa1 o que bloquea las interacciones entre la cara A-C y la IL4Ralfa1 puede ser un excelente candidato para un agente terapéutico anti-IL13. En un esfuerzo para dirigir la selección de anticuerpos contra las partes interactivas-receptor de IL-13, se ha propuesto preparar moléculas de citocina quiméricas. En estas proteínas quiméricas, el bucle que conecta las hélices C y D se sustituirá con la secuencia correspondiente de las especies a usar para la inmunización. En modelos, el bucle C-D es la parte de la molécula más expuesta a la superficie y no interacciona con el receptor de IL-13. Además, este bucle es muy flexible en las estructuras en solución y por lo tanto posiblemente tolera mutaciones sin alterar la topología global de la molécula. En la proteína quimérica resultante, una parte de la molécula aparecerá tanto como la propia del hospedador y por lo tanto inducirá menos probablemente una respuesta inmunitaria significativa. Sin embargo, la parte de la molécula que conserva la secuencia completamente humana aparecerá extraña para las especies huésped y es probable que genere una respuesta inmunitaria. Se espera que los anticuerpos seleccionados de los inmunógenos quiméricos presenten actividad neutralizante en ensayos basados en receptores humanos.

Existe una necesidad de fuertes antagonistas de IL-13 para evaluar el beneficio de su inhibición en enfermedades humanas, particularmente para el asma, y por lo tanto como agentes terapéuticos. Las nuevas variantes de IL-13 descritas en el presente documento son útiles como inmunógenos para potenciar la generación de anticuerpos antagonistas, como agentes de exploración o selección para identificar anticuerpos neutralizantes, o como antagonistas directos de la IL-13 natural. Además, el desarrollo de fuertes y nuevos agonistas de IL-13 puede ser útil para dirigir determinados cánceres que sobreexpresan un receptor de IL-13 sobre la superficie celular (Hussain, S. R. y Puri, R. K., Blood (2000) 95: 3506-351).

Se construyeron nuevos análogos de IL-13. Estos compuestos pueden considerarse como quimeras de la IL-13 de ser humano y de la IL-13 de otras especies ya que utilizan secuencias parciales de especies múltiples. Estos mutantes se diseñaron razonablemente incorporando aminoácidos de regiones secuencialmente distintas de una especie en la secuencia de IL-13 de la IL-13 humana.

Basándose en la homología estructural entre las dos citocinas se propuso un modelo para el complejo IL-13: IL-13R1. Usando el modelo de RMN para IL-13 (archivo de coordenada: 1 GA3) y la secuencia de IL-13, se construyeron análogos de IL-13 que se sugiere que tienen utilidad como agonistas de la IL-13 humana, antagonistas de la IL-13 humana o como un inmunógeno o elemento de bioselección para la generación de anticuerpos anti-IL-13 humana.

El archivo 1GA3 disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> contiene un solapamiento de 20 estructuras por RMN para IL-13. La observación de las estructuras indicó que, aunque las cuatro hélices estaban muy conservadas, los extremos N y C y el bucle entre las hélices C y D eran muy flexibles, como se pone de manifiesto mediante numerosas conformaciones. La primera estructura en el archivo se usó para el análisis de mutantes de IL-13 diseñados que conservarían tanto la estructura como la actividad.

Existe un gran bucle entre las hélices C y D que es adyacente a la hélice B en su mayor parte oculta. Este bucle está en un lugar en el que las pueden aceptarse mutaciones ya que está lejos las hélices A, C y D. El bucle B se define por los aminoácidos Met⁴³ a Asn⁵³ y el bucle CD se define por los aminoácidos Cys⁷¹ a Thr⁸⁸. El final del bucle es difícil de asignar pero definitivamente termina por el comienzo de la hélice D con Glu⁹¹. En la mayoría de las estructuras los aminoácidos implicados en la interacción entre la hélice B y el bucle CD son:

Hélice B: Cys⁴⁵, Leu⁴⁸, Glu⁴⁹, Leu⁵¹, posibilidad de Asn⁵³ y Val⁵⁴

Bucle CD: Cys⁷¹, Val⁷⁵, Lys⁷⁴ (posible), Val⁸⁵, Arg⁸⁶ (posible) Ile⁹⁰

Además, en esta región no hay enlaces de hidrógeno; Pro⁷² no está implicado pero es esencial para el giro y existe una interacción significativa entre Trp³⁵ y los restos del bucle entre Arg⁸⁶ y Lys⁸⁹.

Los restos en la hélice B que interaccionan con el bucle C/D son Leu⁴⁸, Leu⁵¹ y Val⁵⁴.

Ala⁴⁷ cubre un bolsillo y puede ser capaz de sustituirse. No hay enlaces hidrógeno entre el bucle CD y la hélice B.

ES 2 391 097 T3

Los restos en la hélice B que interaccionan con el bucle A/B son Met⁴³, Ala⁴⁷ y Ser⁵⁰.

Se realizó una investigación con el programa Blast del NCBI para identificar otras especies de IL-13 con los siguientes resultados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>):

IL-13 humana

GPVPPSTALRELIEELVNITQNQKAPLCNGSMVWSINLTAGMYCAALES LINVSGCSA
 IEKTQRMLSGFCPHKVSAGQFSSLHVRDTKIEVAQFVKDLLHLKLFREGRFN

5

Sus scrofa

GPVPPHSTALKELIEELVNITQNQKTPLCNGSMVWSVNLTTSMQYCAALES LINISDC
 SAIQKTQRMLSALCSHKPPSEQVPGKHIRDTKIEVAQFVKDLLKHLRMI FRHG

Bos taurus

PVPSATAALKELIEELVNITQNQKVPLCNGSMVWSLNLTS MYCAALDSLISISNCSVI
 QRTKMLNALCPHKPSAKQVSSEYVRDTKIEVAQFLKDLLRHSRIVFRNERFN

10

Canis

PVTPSPTLKELEELVNITQNQASLCNGSMVWSVNLTAGMYCAALES LINVSDCSAIQ
 RTQRMLKALCSQKPAAGQISSERSRDTKIEVIQLVKNLLTYVRGVYRHGNF

Rata

GPVRRSTSPVALRELIEELSNITQDQKTS LCNSSMVWSVDLTAGGFCAALES LTNIS
 SCNAIHRTQRILNGLCNQKASDVASSPPDTKIEVAQFISKLLNYSKQLFRYG

Ratón

GPVPRSVSLPLTLKELEELSNITQDQTPLCNGSMVWSVDLAAGGFCAALDSL TNISN
 CNAIYRTQRILHGLCNRKAPT TVSSLPDTKIEVAHFITKLLSYTKQLFRHGPF

15

Las secuencias de IL-13 de ser humano, bovino, cerdo, perro, rata y ratón se alinearon como se muestra (Fig. 5) usando el algoritmo de ClustalW dentro del Vector Suite NTi (InforMax, Inc., Bethesda, MD).

Las secuencias de la hélice B se proporcionan más adelante subrayando los aminoácidos que no son idénticos a los de ser humano. Los restos en los que se predice la interacción entre la hélice B y el bucle CD para interaccionar se indican mediante un asterisco en la TABLA 3.

20

TABLA 3.

Ser Humano	M YCAALES LINV
Bovino	M YCAALDSLIS
Cerdo	MQYCAALES LIN
Perro	M YCAALES LINV
Rata	GFCAALES LTN
Ratón	GFCVALDSL TN
Interacción	* * * * *

Estas alineaciones sugieren diversos sitios en los que pueden sustituirse aminoácidos en la hélice B y el bucle C/D de la IL-13 humana a partir de otras especies, con conservación de integridad estructural y afinidad de unión a receptores. Usando los restos de la hélice B y el bucle CD que se predice que interaccionan se diseñó una

25

GPVPPSTALR ELIEELVNIT QNQKAPLCNG SMVWSINLTA GMYCAALES Human-Ratón (SEC ID N°: 15)

GPVPPSTALR ELIEELVNIT QNQKAPLCNG SMVWSINLTA GMYCAALES Humana (natural)

INVSGCSAIE KTQRMLSGFC PHKVSAGQFS SLHVRDTKIE VAQFVKDLLL

Humana-Bovina

5 INISGCSAIE KTQRMLSGFC PHKPSAKQVS SEYVRDTKIE VAQFVKDLLL

Humana-Cerdo

INISGCSAIE KTQRMLSGFC SHKPPSEQVP GKHIRDTKIE VAQFVKDLLL

Humana-Perro

INVSGCSAIE KTQRMLSGFC SQKPAAGQIS SERSRDTKIE VAQFVKDLLL

10 Humana-Ratón

INISGCSAIE	KTQRMLSGFC	NRKAPITV	S	SLP	DTKIE
VAQFVKDLLLHuman		HLKRLFREGR	FN		

Humana-Bovina HLKRLFREGR FN

Humana-Cerdo HLKRLFREGR FN

Humana-Perro HLKRLFREGR FN

15 Humana-Ratón HLKRLFREGR FN

Las proteínas señuelo quiméricas se proporcionan en el listado de secuencias como SEC ID N°: 12 (humana-bovina), SEC ID N°: 13 (humana-cerdo), SEC ID N°: 14 (humana-perro), SEC ID N°: 15 (humana-ratón). Un uso de las proteínas quiméricas es para la selección de anticuerpos funcionalmente neutralizantes para la IL-13 humana.

20 Los anticuerpos pueden recuperarse por técnicas de exploración/selección de bibliotecas de anticuerpos tal como presentación de fagos de anticuerpos. En otro aspecto, estas proteínas IL-13 quiméricas son útiles en la selección y/o exploración de anticuerpos neutralizantes. En una aplicación, hibridomas recuperados de animales inmunizados con IL-13 o una o más de estas quimeras pueden explorarse para la unión a una o más de las quimeras no usadas para inmunización, evitando de esta manera que los anticuerpos reconozcan el bucle C/D. En una segunda aplicación, estas proteínas quiméricas pueden usarse en diferentes combinaciones para la selección y exploración de bibliotecas de anticuerpos combinatorias, particularmente bibliotecas de presentación de fagos. Basándose en cuestiones de diseño descritos en el presente documento, la selección o exploración suprimirá la identificación de anticuerpos que reconocen el bucle C/D. Por tanto, se espera que ambas aplicaciones favorezcan el aislamiento de anticuerpos neutralizantes, particularmente aquellos que reconocen las hélices A, C y D que están completamente conservados en las variantes de especies y en las proteínas quiméricas construidas.

30 Un segundo uso de estos mutantes es como antagonistas contra la IL-13 humana. Se sabe que la IL-13 se une a dos subunidades receptoras. Los cambios sutiles en la estructura de la IL-13 humana introducidos por los aminoácidos no humanos en las dos regiones de la molécula pueden tener un efecto alostérico sobre la unión a cualquier subunidad receptora. Mediante la anulación selectiva de la unión a la subunidad del receptor, se crea un antagonista competitivo.

35 **Ejemplo 3: Cálculos para modificar por ingeniería genética proteínas señuelo usando datos de RMN**

La presente invención describe una nueva técnica para la identificación de epítomos en proteínas usando resonancia magnética nuclear (RMN). La RMN es una técnica que identifica átomos específicos (generalmente H1, C13 y N15) y por tanto restos aminoácidos, en base a su entorno local. El espectro de RMN para el carbono e nitrógeno es menos complejo que el espectro de protones pero la abundancia natural de núcleos requeridos puede limitar la sensibilidad. Con proteínas grandes, puede haber una cantidad considerable de solapamiento en los espectros entre átomos en entornos similares. La asignación completa de la mayoría o de todas las resonancias puede realizarse para proteínas grandes proporcionando tiempo suficiente e instrumental de resolución suficientemente alta.

45 Cuando un anticuerpo se une a un antígeno, el entorno local de algunos aminoácidos cambia. Los aminoácidos que pueden someterse a mayores cambios son los más implicados en el contacto con el anticuerpo. La estrategia es identificar un epítomo realizando todas las asignaciones de RMN para el antígeno y para el anticuerpo en estado unido y no unido y determinando que aminoácidos tienen los átomos desplazados. La complejidad de espectros por RMN de un complejo antígeno-anticuerpo hace que dicho análisis sea extremadamente difícil si no imposible con el

instrumental y los procedimientos actuales y no es aplicable a la identificación rutinaria de epítomos.

Los epítomos de proteína pueden identificarse usando proteínas enriquecidas en aminoácidos marcados con C13 o N15 en el que no siempre se requiere la identificación exacta de las señales por RMN. Estos epítomos podrían ser las regiones de unión de anticuerpos o de receptores.

5 Usando tecnología recombinante, la proteína se expresa en medios en los que un solo aminoácido se ha reemplazado con su homólogo marcado con N15 o C13. La proteína generada tiene la misma estructura y actividad que la de su homólogo no marcado. después, se ejecuta un espectro de RMN de N15 o C13 RMN sobre la proteína, tanto en presencia como en ausencia de un anticuerpo de unión. La poca abundancia natural de los núcleos de resonancia de los aminoácidos no marcados simplificarán el espectro de tal manera que un espectro desacoplado
10 mostrará singletes para el espectro del N15 y singletes o patrones simples para el C13 dependiendo de si los aminoácidos se marcaron uniforme o específicamente. En los casos en los que los aminoácidos marcados están implicados en la unión con el anticuerpo, se observará un cambio en la resonancia. Como ejemplo, si una proteína de 200 aminoácidos contiene 10 alaninas marcadas con N15, se observarían 10 singletes en el espectro del N15. Si, cuando se une al anticuerpo, dos de estas cambiasen, sería debido a que su entorno local se ha modificado. A partir
15 de esto, su localización en el epítomo podría estar interferida. La localización específica de las dos alaninas en la secuencia no se conocería a partir de este único espectro. Cuando el proceso se ha repetido 20 veces con un aminoácido diferente marcado cada vez, la composición del epítomo se conocería. Dado que la proteína va a producirse de manera recombinante, la secuencia se conoce. La localización del epítomo puede determinarse a partir de la composición del epítomo y de la secuencia de la proteína. El modelado o algoritmos moleculares que predicen las secuencias expuestas en superficie sobre las proteínas pueden ayudar a la identificación del epítomo.
20

No es necesario preparar 20 proteínas marcadas. El marcaje múltiple (2 o más aminoácidos diferentes marcados en la misma proteína) podría usarse cuando las resonancias para los diferentes aminoácidos fuesen lo suficientemente distintas. Por ejemplo, en una proteína pueden incorporarse alfa-N15 alanina y épsilon-N15 lisina así como épsilon-N15 histidina y alfa-N15 leucina

25 Esta técnica ofrece varias ventajas sobre los procedimientos actuales para la identificación de epítomos. Los procedimientos que usan péptidos sintéticos (alfiler (*pin*), mancha (*spot*) o solución y ELISA o competencia) o fagos pueden pasar por alto epítomos conformacionales. Dado que este procedimiento de RMN, usa la proteína intacta, detectará fácilmente epítomos conformacionales así como lineales. Se reivindica que las variaciones de la síntesis en mancha (*spot*) (por ejemplo matriz de péptidos) son mejores para identificar epítomos conformacionales pero el número de péptidos necesario aumenta exponencialmente con el número de aminoácidos en la proteína hasta el punto de que se necesitarían aproximadamente 2 millones de péptidos para una proteína de peso molecular de 40 kD. La proteólisis, en combinación con la espectroscopia de masas, puede identificar algunos epítomos conformacionales pero la técnica es destructiva para la proteína y se necesitarían cantidades cada vez mayores de proteína para el espectro de masas a medida que aumentase el peso molecular. El procedimiento de RMN es no destructivo. Si la proteína marcada es corta, puede recuperarse después de cada experimento y volver a usarse
30 para mapear otro anticuerpo. Las mutaciones puntuales o “exploración con alanina” de la proteína pueden funcionar bien para la identificación de epítomos lineales y conformacionales aunque la dificultad se encuentra en que cada proteína requiere su propio ADN para la expresión, no todas las mutaciones puntuales se secretan y para cada mutación debe determinarse que la proteína está correctamente plegada. El procedimiento por RMN usa el mismo
35 ADN para todas las proteínas marcadas y las proteínas marcadas se secretan y se pliegan del mismo modo que la proteína no marcada. La cristalografía es la “norma de oro” para la identificación de epítomos. Sus inconvenientes son la gran cantidad de tiempo que requiere, la cantidad de proteína que puede necesitarse, la dificultad de desarrollar un cristal con calidad de difracción y el hecho de que para el mismo antígeno cada anticuerpo requiere una nueva proteína y nuevo cristal.
40

45 **Ejemplo 4:**

Modificación por ingeniería genética de una proteína señuelo quimérica usando estructura cristalina

En base a la estructura cristalina de la IL-4 y de un análogo cercano, la IL-13, se seleccionó, como anticuerpo diana, un dominio de unión a receptor particular. Para la selección de ligandos de unión con esta región de ambas proteínas se modificó por ingeniería genética una proteína quimérica.

50 Se resolvió la estructura cristalina de la IL-4. La estructura cristalina de la IL-3 no se determinó pero se construyó un modelo molecular teórico. Tanto la IL-4 como la IL-13 son proteínas terapéuticamente importantes en base a sus funciones biológicas. Se ha demostrado que la IL-4 es capaz de inhibir respuestas autoinmunes, y que tanto la IL-4 como la IL-13 muestran posibilidades para mejorar respuestas inmunitarias antitumorales. Por otro lado, dado que ambas citocinas están implicadas en la patogénesis de enfermedades alérgicas, el antagonismo de estas citocinas proporcionarían beneficios terapéuticos contra la alergia y el asma alérgica.
55

En la bibliografía se han descrito algunas proteínas mutantes (por ejemplo el antagonista Y124D de la IL-4 y el agonista R112D de la de IL-13, J. Biol. Chem (2000), 275, 14375-14380). Usando modelado molecular, se diseñaron los siguientes nuevos mutantes agonistas de IL-4 e IL-13. Dado que se predijo que estructuralmente eran más

estables que las proteínas naturales se espera que sean ligandos de unión biológicamente más fuertes para los receptores de citocina y que tengan potencial como agentes antineoplásicos. En segundo lugar, estas proteínas pueden usarse como análogos estables de las citocinas naturales para procedimientos de selección en fase en solución y con la intención de hallar un agente de unión selectivo de dominio, por ejemplo, un antagonista de dominio de unión a receptor.

Usando modelado molecular, la estructura cristalina de la IL-4 y el modelo teórico de la IL-13 de la Base de Datos Cristalográfica de Brookhaven, se examinaron las estructuras de la IL-4 y de la IL-13. Se identificaron diversos aminoácidos en el interior de las estructuras en las que pudieron realizarse sustituciones que no se esperaba que afectasen de manera adversa a las estructuras. De hecho, los cálculos de energía sugieren que estas estructuras podrían ser realmente más estables que las secuencias naturales. Las sustituciones realizadas para la IL-4 fueron Thr¹³ ⇒ Ser¹³, Thr²² ⇒ Ser²², Phe⁴⁵ ⇒ Tyr⁴⁵, Phe⁵⁵ ⇒ Tyr⁵⁵ y para la IL-13 fueron Ile⁴⁸ ⇒ Val⁴⁸, Gln⁹⁰ ⇒ Glu⁹⁰, Leu⁹⁵ ⇒ Ile⁹⁵, Leu⁹⁶ ⇒ Ile⁹⁶, Leu⁹⁹ ⇒ Ile⁹⁹, Phe¹⁰³ ⇒ Tyr¹⁰³

Se creó también una base de datos (Fig. 6A y 6B) para la IL-4 que contenía cálculos de los aminoácidos expuestos. La primera columna contiene datos solo para las cadenas laterales y la segunda columna contiene datos para la cadena lateral y principal. En negrita/azul se indican los aminoácidos con una pequeña área expuesta a la superficie o con ninguna.

Los restos ocultos se extrajeron de la tabla y las cisteínas se eliminaron ya que no pueden sustituirse sin comprometer la estructura. A continuación se calcula el resultado de las sustituciones que son posibles:

	ARMAZÓN LATERAL -----	ARMAZÓN TOTAL -----	Sustituciones posibles	Aumento de Energía
(La base es 603,493 kcal/mol)				
7 LEU7	0,04	0,03		
10 ILE10	0,00	0,00		
11 ILE11	0,09	0,07		
13 THR13	0,00	0,00	Ser	607,457/
14 LEU14	0,00	0,00		
17 LEU17	0,01	0,04		
22 THR22	0,01	0,10	Ser	606,487
25 THR25	0,07	0,05		
29 VAL29	0,01	0,03		
32 ILE32	0,01	0,06		
45 PHE45	0,04	0,03	Tyr, His	609,651/652,501
47 ARG47	0,06	0,04		
48 ALA48	0,02	0,01	Ser, Val(?)	684,427/1355,443
49 ALA49	0,00	0,00	Ser	662,543
51 VAL51	0,02	0,03		
52 LEU52	0,00	0,00	Ile	642,620
55 PHE55	0,02	0,04	Tyr	612,756
56 TYR56	0,07	0,06		
76 HIS76	0,02	0,02		
79 LEU79	0,03	0,02		
80 ILE80	0,09	0,07		
83 LEU83	0,00	0,00		
86 LEU86	0,00	0,00		
87 ASP87	0,04	0,03	Asn	1139,982
90 LEU90	0,00	0,00		
93 LEU93	0,02	0,04		
94 ALA94	0,00	0,03	Ser	660,925

(continuación)

	ARMAZÓN LATERAL -----	ARMAZÓN TOTAL -----	Sustituciones posibles	Aumento de Energía
109 LEU109	0,00	0,00		
112 PHE112	0,00	0,01	Tyr	855,581
113 LEU113	0,04	0,03		
116 LEU116	0,02	0,02		
120 MET120	0,00	0,00		

5 La estructura para la IL-4 se minimizó con 100 ciclos de gradiente conjugado, dieléctrico 100, usando todos los hidrógenos el campo de fuerza Tripos y cargas Kollman-Uni. Después, se realizaron los cambios individuales propuestos anteriormente y se calculó la energía. En base a estos cálculos, las mejores sustituciones serían Ser por Thr¹³, Ser por Thr²², Tyr por Phe⁴⁵ y Tyr por Phe⁵⁵.

La estructura cristalina de la IL-4 volvió a recuperarse, se calculó la energía antes de la minimización, las cuatro sustituciones anteriormente realizadas y la energía volvieron a calcularse obteniéndose los siguientes resultados:

Estructura Cristalina Natural

Energía de Tensión de Enlace:	231.645
Energía de curvatura del ángulo:	298.910
Energía Torsional:	453,633
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	46,674
Energía de 1-4 van der Waals:	386,851
Energía de van der Waals:	1134,199
Energía 1-4 Electrostática:	30,608
Energía Electrostática:	1043,112
=====	
Energía Total:	3625.631 kcals/mol

Ser¹³, Ser²², Tyr⁴⁵, Tyr⁵⁵ Estructura

Energía de Tensión de Enlace:	233,378
Energía de curvatura del ángulo:	299,147
Energía Torsional:	449,605
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	46,468
Energía 1-4 de van der Waals:	384,334
Energía de van der Waals:	1125,512
Energía 1-4 Electrostática:	30,677
Energía Electrostática:	1043,004
=====	
Energía Total:	3612.126 kcals/mol

10 Se observan disminuciones en la energía torsional, la energía 1-4 de van der Waals y la energía de van der Waals. En base a los cálculos de energía, se predice que esta estructura es más estable que la secuencia natural. Los aminoácidos modificados están en el interior de la molécula pero, dado que las sustituciones se evaluaron con

ES 2 391 097 T3

respecto a su capacidad de no alterar la estructura secundaria, la topología superficial y por tanto la actividad funcional no debe cambiar.

Se construyó una tabla similar para la IL-13 (Fig. 7A y 7B). La estructura cristalina no se ha publicado pero se encuentra disponible un modelo teórico. Se realizaron diez ciclos de minimización sobre la estructura inicial y la modificada.

5

Los restos internos que podrían modificarse.

	ARMAZÓN LATERAL -----	ARMAZÓN TOTAL -----	Sustituciones posibles	Aumento de energía
(La base es 1725,421 kcal/mol)				
6 LEU6	0,06	0,07		
9 LEU9	0,03	0,02		
13 LEU13	0,00	0,03		
17 THR17	0,00	0,03	Ser	1987,449
44 LEU44	0,07	0,05		
47 LEU47	0,03	0,02		
48 ILE48	0,08	0,06	Val	1722,283
50 VAL50	0,06	0,05	Ile	1841,982
51 SER51	0,00	0,00	Thr	2080,486
52 GLY52	-	0,00		
63 LEU63	0,00	0,00		
66 PHE66	0,04	0,04	Tyr/His	
	1995.898/1766.541			
69 HIS69	0,01	0,01		
72 SER72	0,04	0,03		
73 ALA73	0,02	0,01		
77 SER77	0,00	0,01		
90 GLN90	0,02	0,04	Glu	1730,812
92 VAL92	0,01	0,01	Ile	9159,549
95 LEU95	0,00	0,01	Ile	1631,393
96 LEU96	0,00	0,00	Ile	1619,286
99 LEU99	0,03	0,03	Ile	1628,907
103 PHE103	0,01	0,01	Tyr	1624,121

Aunque Phe66 por Tyr tiene una energía alta, parece una buena sustitución. La energía más alta se debe a mayores interacciones van der Waals del grupo hidroxilo

10 Phe66 e His69 interaccionan (π - π). Ambos deben seguir siendo aromáticos.

La sustitución de Val92 por Ile proporciona una energía alta pero se reduce drásticamente una pequeña cantidad de minimización. Probablemente es una sustitución aceptable.

Phe103 por Tyr añade un enlace de hidrógeno adicional con His69 y sería una buena sustitución.

ES 2 391 097 T3

La estructura para la IL-13 volvió a recuperarse, se calculó la energía, se realizaron sustituciones y se recalculó la energía dando los siguientes resultados:

Estructura Modelada Inicial

Energía de Tensión de Enlace:	290,164
Energía de curvatura del ángulo:	390,042
Energía Torsional:	388,721
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	30,217
Energía 1-4 de van der Waals:	286,329
Energía de van der Waals:	210,384
Energía 1-4 Electrostática:	27,906
Energía Electrostática:	-1,547

=====

Energía Total: 1622,216 kcals/mol

Val⁴⁸, Glu⁹⁰, Ile⁹⁵, Ile⁹⁶, Ile⁹⁹, Tyr¹⁰³

Energía de Tensión de Enlace:	288,604
Energía de curvatura del ángulo:	383,273
Energía Torsional:	384,452
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	29,889
Energía 1-4 de van der Waals:	284,920
Energía de van der Waals:	228,808
Energía 1-4 Electrostática:	27,989
Energía Electrostática:	-1,594

=====

Energía Total: 1626,342 kcals/mol

- 5 Hay una disminución en la energía de tensión de enlace, energía de curvatura del ángulo, energía 1-4 de van der Waals y energía de van der Waals con un aumento en la energía torsional y energía de tensión de enlace. Estas últimas interacciones podrían reducirse mediante un reposicionamiento de las cadenas secundarias de Ile recién colocadas.

Estructura modificada

Energía kcals/mol	Fuerza de RMS kcals/mol A	Fuerza máxima kcals/mol A	Iteración recuento	Eval recuento	Tiempo UPC tiempo
1626,342	25,436	243,087		0	1 0
0:00:00,33					
1326,768	14,851	134,040		1	8 0
0:00:01,11					
1207,892	10,799	137,468		2	14 0
0:00:01,78					

ES 2 391 097 T3

(continuación)

Estructura modificada

Energía kcal/mol	Fuerza de RMS kcal/mol A	Fuerza máxima kcal/mol A	Iteración recuento	Eval recuento	Tiempo UPC tiempo
1121,012	10,155	171,991		3	20 0
0:00:02,44					
1065,839	7,613	105,188		4	26 0
0:00:03,11					
1031,513	6,361	73,260		5	32 0
0:00:03,76					
995,717	6,643	64,166		6	38 0
0:00:04,42					
965,486	5,399	54,345		7	44 0
0:00:05,09					
945,615	5,429	61,839		8	50 0
0:00:05,76					
924,480	4,655	50,214		9	56 0
0:00:06,42					
907,908	4,448	55,866		10	62
0:00:07,08					

ADVERTENCIA : Número máximo de iteraciones alcanzadas (10)

Energía para la molécula: MODELO 1 de INTERLEUCINA-13 (MODELO TEÓRICO)

Energía de Tensión de Enlace:	49,661
Energía de Curvatura de Ángulo:	297,149
Energía Torsional:	328,222
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	8,774
Energía 1-4 de van der Waals:	189,249
Energía de van der Waals:	8,139
Energía 1-4 Electrostática:	28,271
Energía Electrostática:	-1,556

=====

Energía Total:	907,908 kcal/mol		
	Número	Tiempo UPC (segundos)	% de Total
Reconstrucciones No Unidas	2	0,08	1,08
Evaluaciones de Energía	64	7,33	98,92

Número promedio de van der Waals + pares electrostáticos = 5677

Número promedio de 1-4 van der Waals + pares electrostáticos = 3415

Número promedio de aumentos de van der Waals + pares electrostáticos = 248

ES 2 391 097 T3

Estructura Inicial

Energía para la molécula: MODELO 1 INTERLEUCINA-13 (MODELO TEÓRICO)

Energía	Fuerza RMS	Fuerza máxima	Iteración	Evaluación	Tiempo UPC
kcal/mol	kcal/mol A	kcal/mol A	recuento		recuento tiempo
1622,189	25,201	243,087	0		1 0
0:00:00,34					
1328,927	14,694	132,377	1		8 0
0:00:01,12					
1212,237	10,675	135,392	2		14 0
0:00:01,79					
1127,031	10,061	169,922	3		20 0
0:00:02,47					
1072,925	7,499	103,477	4		26 0
0:00:03,13					
1039,540	6,289	73,212	5		32 0
0:00:03,81					
1004,102	6,619	64,355	6		38 0
0:00:04,49					
973,968	5,370	54,031	7		44 0
0:00:05,15					
954,110	5,428	64,203	8		50 0
0:00:05,82					
932,787	4,648	46,556	9		56 0
0:00:06,50					
915,954	4,442	52,618	10		62 0
0:00:07,16					

ADVERTENCIA : Número máximo de iteraciones alcanzadas (10)

Energía para la molécula: MODELO 1 de INTERLEUCINA-13 (MODELO TEÓRICO)

Energía de Tensión de Enlace:	48,807
Energía de Curvatura de Enlace:	300,150
Energía Torsional:	331,002
Energía de Curvatura Fuera de Plano:	8,945
Energía 1-4 de van der Waals:	192,067
Energía de van der Waals:	8,307
Energía 1-4 Electrostática:	28,178
Energía Electrostática:	-1,503

=====

Energía Total: 915,954 kcal/mol

(continuación)

	Número	Tiempo UPC (segundos)	% de Total
Reconstrucciones No Unidas	2	0,08	1,07
Evaluaciones de Energía	64	7,41	98,93

Número promedio de van der Waals + pares electrostáticos = 5717

Número promedio de 1-4 van der Waals + pares electrostáticos = 3426

Número promedio de aumentos de van der Waals + pares electrostáticos = 247

5 Usando modelado molecular, la estructura cristalina de la IL-4 y el modelo teórico de la IL-13 de la Base de Datos Cristalográfica de Brookhaven, se examinaron las estructuras de la IL-4 y de la IL-13. Se identificaron diversos aminoácidos en el interior de las estructuras en las que pudieron realizarse sustituciones que no se esperaba que afectasen de manera adversa a las estructuras. De hecho, los cálculos de energía sugieren que estas estructuras podrían ser realmente más estables que las secuencias naturales. Las sustituciones realizadas para la IL-4 fueron Thr¹³ ⇒ Ser¹³, Thr²² ⇒ Ser²², Phe⁴⁵ ⇒ Tyr⁴⁵, Phe⁵⁵ ⇒ Tyr⁵⁵ y para la IL-13 fueron Ile⁴⁸ ⇒ Val⁴⁸, Gln⁹⁰ ⇒ Glu⁹⁰, Leu⁹⁵ ⇒ Ile⁹⁵, Leu⁹⁶ ⇒ Ile⁹⁶, Leu⁹⁹ ⇒ Ile⁹⁹, Phe¹⁰³ ⇒ Tyr¹⁰³.

10 Las secuencias completas son:

Construcción de IL-4 (SEC ID N°: 16)

HKCDITLQEI IKSLNSLTEQ KSLCTELTVT DIFAASKNTT EKETYCRAAT VLRQYYSHHE
 KDTRCLGATA QQFHRHKQLI RFLKRLDRNL WGLAGLNSCP VKEANQSTLE NFLERLKTIM
 REKYSKCSS

Construcción de IL-13 (SEC ID N°: 17)

PPSTALRELI EELVNITQNO KAPLCNGSMV WSINLTAGMY CAALESLVNV SGCSAIEKTQ
 RMLSGFCPHK VSAGQFSSLH VRDTKIEVAE FVKDILLHIK KLYREGRFN

15 En las que los aminoácidos subrayados indican las sustituciones.

La energía más baja de la estructura modificada después de minimización secundaria sugiere que esta estructura es más estable que la de la secuencia parental. Estas construcciones y otras preparadas de una manera análoga pueden usarse en el procedimiento de la presente invención.

20 **Listado de secuencias**

<110> Centocor, Inc.
 O'Neil, Karyn
 Heavner, George

25 Sweet, Raymond

<120> Procedimiento de bioselección en fase en solución usando proteínas señuelo modificadas por ingeniería genética

30 <130> CEN5055

<140> TBD
 <141> 21-03-2005

35 <150> 60/565.633
 <151> 26-04-2004

<150> 60/565.674
 <151> 26-04-2004

40 <160> 17

ES 2 391 097 T3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> FT murino con 8 restos Hu

<400> 1

Gly Ile Pro Glu Lys Ala Phe Asn Leu Thr Trp Ile Ser Thr Asp Phe
1 5 10 15

Lys Thr Ile Leu Glu Trp Gln Pro Lys Pro Thr Asn Tyr Thr Tyr Thr
20 25 30

Val Gln Ile Ser Asp Arg Ser Arg Asn Trp Lys Asn Lys Cys Phe Ser
35 40 45

Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val Lys Asp Val
50 55 60

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

ES 2 391 097 T3

Val His Gly Asp Gly Asp Gln Leu Val Ile His Gly Glu Glu Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Asn Ala Pro Lys Phe Leu Pro Tyr Arg Asp Thr Asn Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Val Ile Gln Gln Phe Glu Gln Asn Gly Arg Lys Leu Asn Val
115 120 125

Val Val Lys Asp Ser Leu Thr Leu Val Arg Lys Asn Gly Thr Phe Leu
130 135 140

Thr Leu Arg Gln Val Phe Gly Lys Asp Leu Gly Tyr Ile Ile Tyr Tyr
145 150 155 160

Arg Lys Gly Ser Ser Thr Gly Lys Lys Thr Asn Lys Thr Asn Thr Asn
165 170 175

Glu Phe Ser Ile Asp Val Glu Glu Gly Val Ser Tyr Cys Phe Phe Val
180 185 190

Gln Ala Val Ile Pro Ser Arg Lys Val Asn Arg Lys Ser Pro Asp Ser
195 200 205

Ser Thr Val Cys Thr Glu Gln Trp Lys Ser Phe Leu Gly
210 215 220

- <210> 2
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Humana

- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (26)..(35)
- <223> CDR1

- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (50)..(67)
- <223> CDR2

- <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (100)..(107)
- <223> CDR3

- <400> 2

ES 2 391 097 T3

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

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

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

Asn Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Asp Ser Ser Thr Asp Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

5 <210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (26)..(34)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (49)..(65)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (98)..(108)
 <223> CDR3

<400> 6

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

ES 2 391 097 T3

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr Trp
 20 25 30

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

Phe Ile Asp Pro Asp Asp Ser Asp Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 50 55 60

Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 7
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (23)..(33)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (49)..(55)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (88)..(97)
 <223> CDR3

<400> 7

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

ES 2 391 097 T3

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

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

Arg Asp Thr Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Tyr Gly Val Ser Asn
 85 90 95

Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

5 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (26)..(34)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (49)..(65)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (98)..(108)
 <223> CDR3

<400> 8

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

25 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Tyr Ser Phe Thr Asn Ser Trp
 20 25 30

ES 2 391 097 T3

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

Ile Ile Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Thr Ser Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 50 55 60

Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Humana

5

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (23)..(33)
 <223> CDR1

10

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (49)..(55)
 <223> CDR2

15

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (88)..(96)
 <223> CDR3

20

<400> 9

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

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

25

ES 2 391 097 T3

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

Gln Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Tyr Thr Tyr Ser Thr Ser Trp
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

5 <210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (26)..(37)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (52)..(67)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> UNIÓN
 <222>. (100)..(107)
 <223> CDR3

<400> 10

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Leu Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

ES 2 391 097 T3

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Ser Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Thr Ser
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Lys Gln Glu Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 11
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Humana

10 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (23)..(33)
 <223> CDR1

15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (49)..(53)
 <223> CDR2

20 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (86)..(93)
 <223> CDR3

<400> 11

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

Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Glu Lys Tyr Ala
 20 25 30

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

25

ES 2 391 097 T3

Asp Asp Asn Asn Arg Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
 50 55 60

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu Asp Glu
 65 70 75 80

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ile Glu Ile Thr Val Phe Gly
 85 90 95

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

- <210> 12
- <211> 112
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Proteína quimérica basada en secuencia humana con sustituciones de restos homólogos de bovino
- <400> 12

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30

Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
 35 40 45

Ser Leu Ile Asn Ile Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
 50 55 60

Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Pro Ser Ala Lys Gln Val Ser
 65 70 75 80

Ser Glu Tyr Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
 85 90 95

Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 100 105 110

- 15 <210> 13
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 20 <223> Proteína quimérica basada en secuencia humana con sustituciones de restos homólogos de cerdo
- <400> 13

ES 2 391 097 T3

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15

Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30

Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Gln Tyr Cys Ala Ala Leu
 35 40 45

Glu Ser Leu Ile Asn Ile Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln
 50 55 60

Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Ser His Lys Pro Pro Ser Glu Gln Val
 65 70 75 80

Pro Gly Lys His Ile Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val
 85 90 95

Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe
 100 105 110

Asn

- <210> 14
- 5 <211> 112
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> Proteína quimérica basada en secuencia humana con sustituciones de restos homólogos de perro
- <400> 14

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu

ES 2 391 097 T3

<400> 17

Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile
 1 5 10 15

Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser
 20 25 30

Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu Ser Leu Val
 35 40 45

Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg Met Leu Ser
 50 55 60

Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His
 65 70 75 80

Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Glu Phe Val Lys Asp Ile Ile
 85 90 95

Leu His Ile Lys Lys Leu Tyr Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para identificar un anticuerpo que se une a un epítipo preseleccionado de una proteína diana que comprende:

- 5 a) proporcionar una biblioteca de partículas de fago que exprese anticuerpos sobre la superficie de las partículas de fago;
- b) preparar una proteína señuelo que tenga cambios en las secuencias de aminoácidos correspondientes al epítipo preseleccionado de la proteína diana, y difiriendo la proteína señuelo de la proteína diana solo en el epítipo preseleccionado;
- 10 c) incubar la biblioteca de partículas de fago con la proteína diana para seleccionar partículas de fago con anticuerpos que se unen a la proteína diana;
- d) añadir la proteína señuelo como un competidor a una concentración en exceso molar para seleccionar negativamente las partículas de fago específicas para el epítipo preseleccionado;
- e) separar las partículas de fago que se unan a la proteína diana de las que se unan a la proteína señuelo y
- f) recuperar las partículas de fago unidas a la proteína diana.

15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

- a) el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fab, Fab', o F(ab')₂ o un derivado de los mismos; o
- b) el anticuerpo se une al epítipo TF8-5G9 sobre el factor tisular murino.

Fig. 1

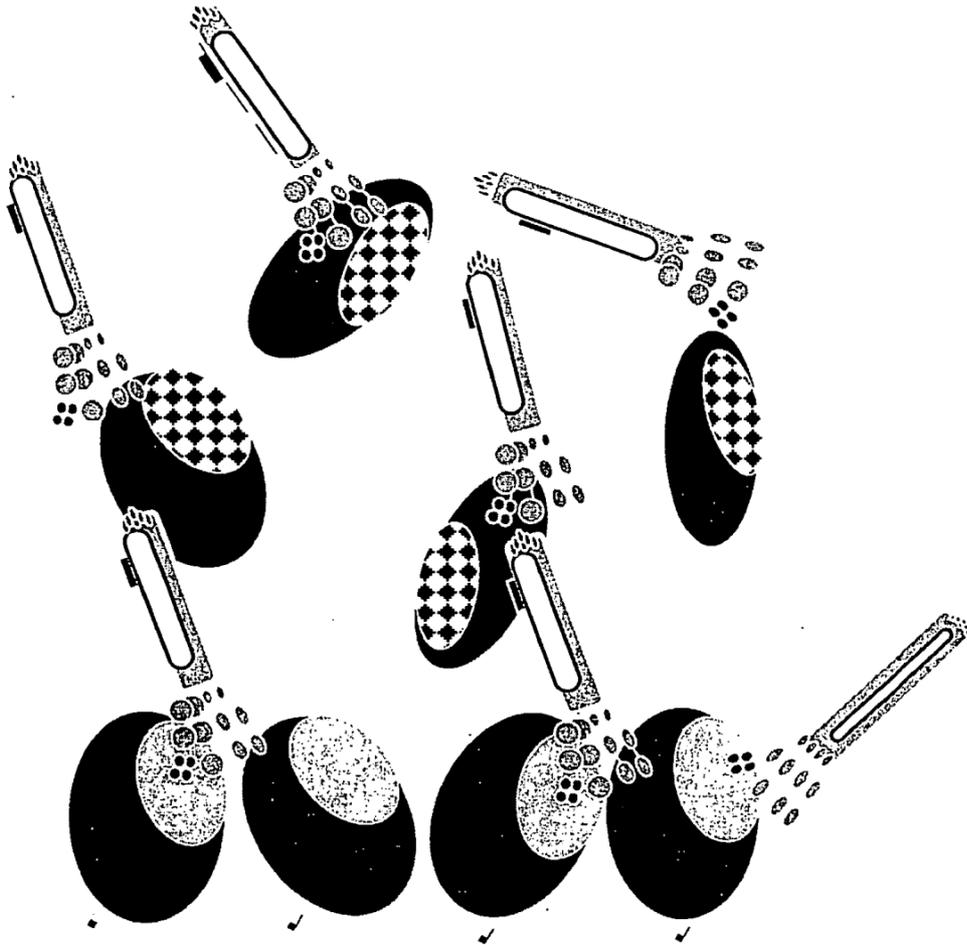


Fig. 2

		Cadena pesada			Cadena ligera					
PHD	SEC ID N°	Marco conservado	CDR1	CDR2	CDR3	SEC ID N°	Marco conservado	CDR1	CDR2	CDR3
103	2	VH5	GYSFNSWIA	GLIGPGHSHYTKYSPSFQG	INMGYFDY	3	V _{kappa} 3	SGDSLGLKKFVS	DDSNRPS	GTVDQTIQHHDV
104	4	VH5	YSFTSNWIG	WIYPSDSMTRYSPSFQG	YLFGLFDN	5	V _{kappa} 3	SGDNLGSIYVS	NDNNRPS	ATYDSSITL
126	6	VH5	YSFSNYWIG	FIDPDDSDTMYSPSFQG	ALYMQGGSFDS	7	V _{kappa} 3	SGDNLGSIYVS	RDTDRPS	QSYDYGVSINQ
127	8	VH5	YSFTNSWIS	IIDPDDSYTSYSPSFQG	GAGYGRMFGDV	9	V _{kappa} 3	SGDNLGSIYAS	QDDNRPS	GAYTYSTSW
130	10	VH2	GLSLSTSGVGVG	LLYSNDDKRYSTSLKT	YKQETIDY	11	V _{kappa} 3	SGDNLGEKYAY	DDNNR	QSYDIEIT

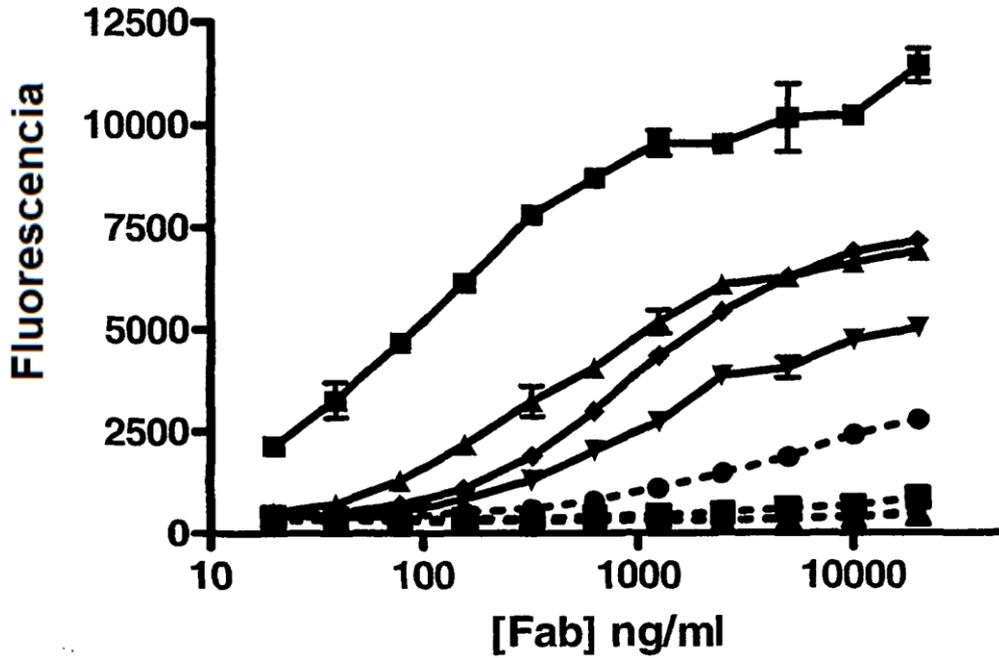
Secuencias marco conservadas:

VH5 : QVQLVQSGAEVKKPQESLKISKCKGS CDR1 WVRQMPGKGLEWMMG CDR2 QVTISADK
SISTAYLQWSSLKASDTAMYICAR CDR3 WGQGTLLVTVSS

VH2 : QVQLKESGPALVKPTQTLTLTCTFS CDR1 WIRQPPGKALEWLA CDR2
RLTISKDTSKNQVVLTMNMDPVDATFYICAR CDR3 WGQGTLLVTVSS

V_{kappa}3 : DIELTQPPSVSVAPGQTARISC CDR1 WYQKPGQAPFLVIY CDR2
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYC CDR3 VFGGGTKLTVLG

FIG 3.



- PHD 127
- ▲ PHD 126
- ▼ PHD 103
- ◆ PHD 104
- PHD 127 + FT Hu/m
- PHD 126 + FT Hu/m
- ▲- PHD 104 + FT Hu/m
- ▼- PHD 103 + FT Hu/m

Fig. 4

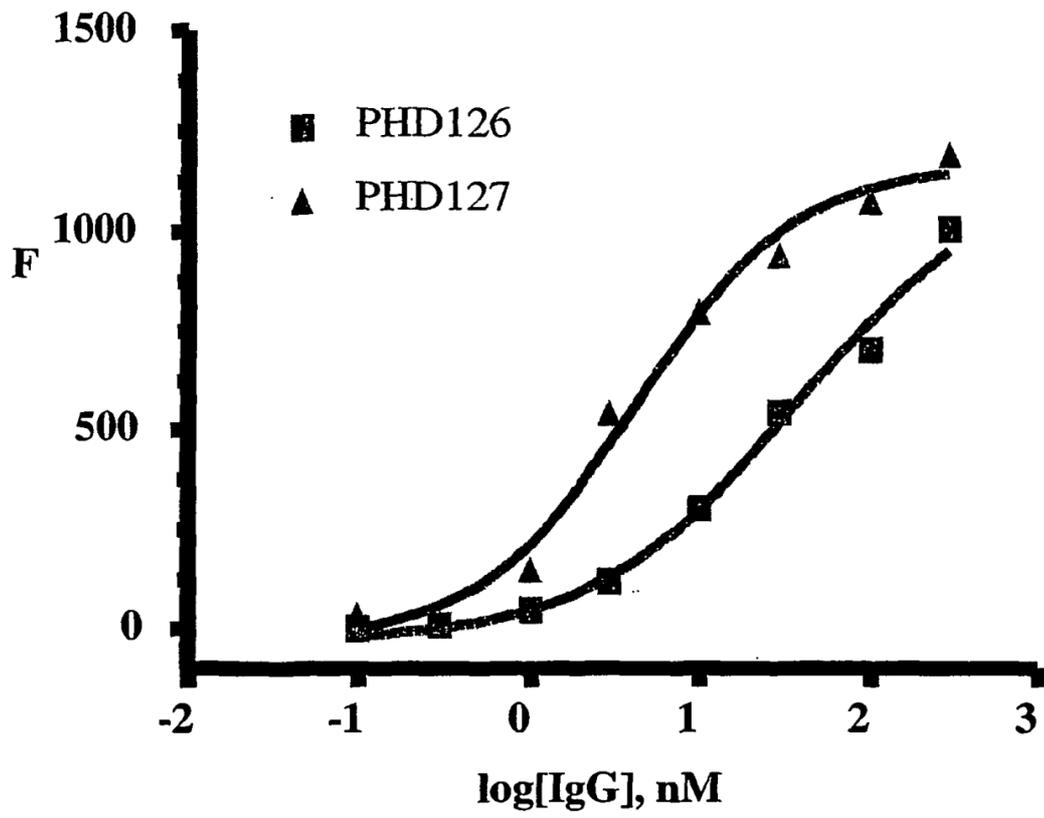


Fig. 5

	1	50
IL-13 de perro	(1) ----PVTPSPTLKELEEEIVNLETQN-QASLCNGSMVWSVNLTA-GMYCA	
IL-13 humana	(1) ----GPVPPSTA REL EEIVNLETQNKAPICNGSMVWSINLTA-GMYCA	
IL-13 de ratón	(1) GPVPEVSLPLT IKEL EEISNLETQDOTP-LCNGSMVWSVDIAA-GGFCV	
IL-13 de cerdo	(1) ---GPVPPHSTALKELEEEIVNLETQNKPTPLCNGSMVWSVNIITTSMOYCA	
IL-13 de rata	(1) GPVRETSPPVAL REL EEISNLETQDKTSLCNSSMVWSVDLTA-GGFCV	
IL-13 bovina	(1) ----PVPSATALKELEEEIVNLETQNKVPLCNGSMVWSINLTS-SMYCA	
	51	100
IL-13 de perro	(44) ALES ILINVS DC SAT OR IT OR MI KAL C SOK PA AG OT ISS SERS RDI K EE VI QL V	
IL-13 humana	(46) ALES ILINVS GC SAT EKT OR MI SG FC PH KV SAG OF SSL HVR DI K EE VA Q OF V	
IL-13 de ratón	(49) ALDS ELINIS NG NAT YR T OR IT HGL GN RK APT TV SS---LP DT K EE VA HF I	
IL-13 de cerdo	(48) ALES ILINIS DC SAT OK T OR MI SAL C SH K PP SE OV PG KH IR DI K EE VA Q OF V	
IL-13 de rata	(50) ALES ILINIS SS NAT HR T OR IT ENGL GN OK AS DV ASS---PP DT K EE VA Q OF I	
IL-13 bovina	(45) ALDS ELISIS NG SV TOR IT IK M INAL C PH K PS AK OV S SEY V RD IK EE VA Q OF LI	
	101	117
IL-13 de perro	(94) KN EL IV RG VY R H GNF-	
IL-13 humana	(96) KD EL HL K L F R EGR FN	
IL-13 de ratón	(96) TK EL SY T K OL F R H GP F -	
IL-13 de cerdo	(98) KD EL KH L EM L F F H G---	
IL-13 de rata	(97) SK EL IN Y S K OL F R Y G ---	
IL-13 bovina	(95) KD EL IR S R I M F R NER FN	

FIG. 6A

	MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	MARCO ESTRUCTURAL TOTAL		MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	MARCO ESTRUCTURAL TOTAL
1 HIS1	0,46	0,58	31 ASP31	0,28	0,18
2 LYS2	0,42	0,36	32 ILE32	0,01	0,06
3 CYS3	0,54	0,67	33 PHE33	0,08	0,21
4 ASP4	0,53	0,41	34 ALA34	0,25	0,42
5 ILE5	0,95	0,76	35 ALA35	0,19	0,32
6 THR6	0,23	0,17	36 SER36	0,98	0,86
7 LEU7	0,04	0,03	37 LYS37	0,76	0,78
8 GLN8	0,57	0,42	38 ASN38	0,83	0,65
9 GLU9	0,72	0,50	49 THR39	0,19	0,42
10 ILE10	0,00	0,00	40 THR40	0,59	0,51
11 ILE11	0,09	0,07	41 GLU41	0,39	0,34
12 LYS12	0,49	0,39	42 LYS42	0,80	0,60
13 THR13	0,00	0,00	43 GLU43	0,52	0,36
14 LEU14	0,00	0,00	44 THR44	0,38	0,28
15 ASN15	0,64	0,46	45 PHE45	0,04	0,03
16 SER16	0,51	0,39	46 CYS46	0,00	0,00
17 LEU17	0,01	0,04	47 ARG47	0,06	0,04
18 THR18	0,11	0,29	48 ALA48	0,02	0,01
19 GLU19	1,16	0,97	49 ALA49	0,00	0,00
20 GLN20	0,11	0,13	50 THR50	0,21	0,17
21 LYS21	0,56	0,50	51 VAL51	0,02	0,03
22 THR22	0,01	0,10	52 LEU52	0,00	0,00
23 LEU23	0,55	0,53	53 ARG53	0,65	0,52
24 CYS24	0,01	0,00	54 GLN54	0,60	0,47
25 THR25	0,07	0,05	55 PHE55	0,02	0,04
26 GLU26	0,89	0,72	56 TYR56	0,07	0,06
27 LEU27	0,20	0,16	57 SER57	0,51	0,57
28 THR28	0,48	0,48	58 HIS58	0,80	0,73
29 VAL29	0,01	0,03	59 HIS59	0,17	0,13
30 THR30	0,24	0,19	60 GLU60	0,59	0,41

Fig. 6B

	MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	MARCO ESTRUCTURAL TOTAL	93 LEU93	0,02	0,04
			94 ALA94	0,00	0,03
61 LYS61	0,85	0,78			
62 ASP62	0,19	0,16			
63 THR63	1,02	0,87			
64 ARG64	0,69	0,62			
65 CYS65	0,01	0,00			
66 LEU66	0,41	0,30			
67 GLY67	-	0,30			
68 ALA68	0,84	0,87			
69 THR69	0,59	0,50			
70 ALA70	1,08	0,77			
71 GLN71	0,77	0,63			
72 GLN72	0,27	0,20			
73 PHE73	0,59	0,46			
74 HIS74	0,77	0,59			
75 ARG75	0,27	0,22			
76 HIS76	0,02	0,02			
77 LYS77	0,65	0,51			
78 GLN78	0,42	0,33			
79 LEU79	0,03	0,02			
80 ILE80	0,09	0,07			
81 ARG81	0,71	0,59			
82 PHE82	0,30	0,23			
83 LEU83	0,00	0,00			
84 LYS84	0,47	0,39			
85 ARG85	0,59	0,47			
86 LEU86	0,00	0,00			
87 ASP87	0,04	0,03			
88 ARG88	0,58	0,54			
89 ASN89	0,15	0,13			
90 LEU90	0,00	0,00			
91 TRP91	0,26	0,23			
92 GLY92	-	0,56			

ES 2 391 097 T3

	MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	MARCO ESTRUCTURAL TOTAL			
95 GLY95	-	0,81			
96 LEU96	0,34	0,26			
97 ASN97	0,87	0,85			
98 SER98	0,75	0,52			
99 CYS99	0,03	0,32			
100 PRO100	0,47	0,43			
101 VAL101	0,12	0,29			
102 LYS102	0,63	0,67			
103 GLU103	0,23	0,26			
104 ALA104	1,04	0,84			
105 ASN105	0,69	0,56			
106 GLN106	0,47	0,45			
107 SER107	0,21	0,16			
108 THR108	0,30	0,24			
109 LEU109	0,00	0,00			
110 GLU110	0,48	0,39			
111 ASN111	0,66	0,49			
112 PHE112	0,00	0,01			
113 LEU113	0,04	0,03			
114 GLU114	0,78	0,56			
115 ARG115	0,53	0,43			
116 LEU116	0,02	0,02			
117 LYS117	0,49	0,38			
118 THRU 8	0,74	0,59			
119 ILE119	0,36	0,29			
120 MET120	0,00	0,00			
121 ARG121	0,53	0,44			
122 GLU122	0,85	0,62			
123 LYS123	0,18	0,14			
124 TYR124	0,51	0,41			
125 SER125	0,71	0,47			
126 LYS126	0,65	0,68			
127 CYS127	0,13	0,35			
128 SER128	0,57	0,68			

FIG. 7A.

	MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	AREA- MARCO ESTRUCTURAL		MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	ÁREA- MARCO ESTRUCTURAL
1	0,51	0,69	31	0,21	0,17
PRO1			TRP31		
2	0,12	0,45	32	0,53	0,44
PRO2			SER32		
3	0,73	0,50	33 ILE33	0,44	0,47
SER3					
4	1,11	0,93	34	0,30	0,36
THR4			ASN34		
5	0,39	0,30	35	0,23	0,21
ALA5			LEU35		
6	0,06	0,07	36	0,72	0,78
LEU6			THR36		
7	0,79	0,66	37	1,07	0,91
ARG7			ALA37		
8	0,76	0,54	38	-	0,32
GLU8			GLY38		
9	0,03	0,02	39	0,71	0,57
LEU9			MET39		
10	0,20	0,15	40	0,40	0,38
ILE10			TYR40		
11	0,84	0,72	41	0,54	0,41
GLU11			CYS41		
12	0,33	0,32	42	0,41	0,22
GLU12			ALA42		
13	0,00	0,03	43	0,23	0,14
LEU13			ALA43		
14	0,28	0,19	44	0,07	0,05
VAL14			LEU44		
15	0,73	0,53	45	0,14	0,10
ASN15			GLU45		
16	0,16	0,14	46	0,15	0,09
ILE16			SER46		
17	0,00	0,03	47	0,03	0,02
THR17			LEU47		
18	0,64	0,60	48 ILE48	0,08	0,06
GLN18					
19	0,88	0,73	49	0,34	0,24
ASN19			ASN49		
20	0,60	0,60	50	0,06	0,05
GLN20			VAL50		
21	0,75	0,60	51SER51	0,00	0,00
LYS21					
22	0,98	0,75	52	-	0,00
ALA22			6LY52		
23	0,21	0,17	53	0,34	0,33
PRO23			CYS53		
24	0,32	0,23	54	0,24	0,54
LEU24			SER54		
25	0,70	0,49	55	0,51	0,50
CYS25			ALA55		
26	0,69	0,50	56 ILE56	0,03	0,12
ASN26					
27	-	0,27	57	1,29	1,10
GLY27			GLU57		
28	0,12	0,12	58	0,62	0,47
SER28			LYS58		
29	0,31	0,24	59	0,41	0,41
MET29			THR59		
30	0,21	0,14	60	0,91	0,77
VAL30			GLN60		

FIG. 7B**FIG. 7B.**

	MARCO ESTRUCTURAL LATERAL	ÁREA MARCO ESTRUCTURAL
61 ARG61	0,61	0,50
62 MET62	0,08	0,13
63 LEU63	0,00	0,00
64 SER64	0,13	0,16
65 GLY65	-	0,53
66 PHE66	0,04	0,04
67 CYS67	0,16	0,17
68 PRO68	0,76	0,66
69 HIS69	0,01	0,01
70 LYS70	0,25	0,25
71 VAL71	0,82	0,72
72 SER72	0,04	0,03
73 ALA73	0,02	0,01
74 GLY74	-	0,40
75 GLN75	0,67	0,75
76 PHE76	0,34	0,35
77 SER77	0,00	0,01
78 SER78	0,73	0,74
79 LEU79	0,82	0,78
80 HIS80	0,85	0,65
81 VAL81	0,46	0,43
82 ARG82	0,39	0,33
83 ASP83	0,95	0,69
84 THR84	0,29	0,36