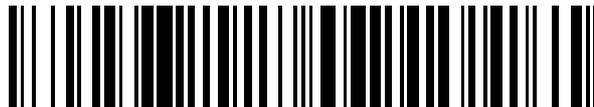


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 803**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C40B 40/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2010 E 10787815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2379581**

54 Título: **Un método para identificar proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas con capacidad para unirse a ligandos**

30 Prioridad:

14.12.2009 EP 09179147

07.05.2010 EP 10162264

08.10.2010 EP 10186980

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

06.02.2014

73 Titular/es:

SCIL PROTEINS GMBH (100.0%)

Heinrich-Damerow-Strasse 1

06120 Halle/Saale, DE

72 Inventor/es:

KUNERT, ANJA;

NERKAMP, JÖRG;

STEUERNAGEL, ARND;

FIEDLER, MARKUS;

FIEDLER, ERIK y

GÖTTLER, THOMAS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 441 803 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

Un método para identificar proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas con capacidad para unirse a ligandos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para identificar ubiquitina heteromultímera con capacidad de unión a un ligando. Además, la invención proporciona genotecas de ADN que codifican una población de dichas proteínas de ubiquitina heteromultímeras así como bancos de proteínas obtenidos mediante la expresión de dichas genotecas de ADN, células y fagos que contienen dicho ADN o proteínas, polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión y vectores que comprenden dichos polinucleótidos. Además se proporcionan nuevas proteínas de unión que se basan en ubiquitinas heteromultímeras que son capaces de unirse específicamente con alta afinidad a ligandos seleccionados.

Antecedentes de la invención

15 Existe una demanda creciente de moléculas de unión que consisten en aminoácidos que no sean inmunoglobulinas. Aunque hasta la fecha los anticuerpos representan la clase mejor establecida de moléculas de unión, todavía existe una necesidad de nuevas moléculas de unión con el fin de dirigirse a ligandos con alta afinidad y especificidad, ya que las moléculas de inmunoglobulina tienen grandes inconvenientes. A pesar de que se pueden producir con bastante facilidad y se pueden dirigir a casi cualquier diana, tienen una estructura molecular bastante compleja. Existe una necesidad actual de sustituir anticuerpos por moléculas más pequeñas que se puedan manejar de forma sencilla. Estos agentes de unión alternativos se pueden utilizar beneficiosamente, por ejemplo, en el campo de la medicina de diagnóstico, profilaxis y tratamiento de enfermedades.

20 Proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, conocidas en general como armazones proteicos, se pueden utilizar como material de partida para el diseño de dichos agentes de unión alternativos. Estos armazones contienen típicamente una o varias regiones que son susceptibles de una variación específica o aleatoria de la secuencia, y tal aleatorización de la secuencia se realiza frecuentemente para producir un banco de proteínas a partir del cual se pueden seleccionar las moléculas de unión específicas. Se espera que moléculas con un tamaño menor que los anticuerpos y una afinidad comparable o incluso mejor hacia un antígeno diana, sean superiores a los anticuerpos en términos de propiedades farmacocinéticas e inmunogenicidad.

25 Una variedad de enfoques previos utilizan armazones proteicos como material de partida para proteínas de unión. Por ejemplo, en el documento WO 99/16873 se desarrollaron proteínas modificadas de la familia de la lipocalina (denominadas Anticalinas) que presentan actividad de unión a ciertos ligandos. La estructura de los péptidos de la familia de la lipocalina se modifica con sustituciones de aminoácidos en su bolsillo de unión al ligando natural, utilizando métodos de ingeniería genética. Como las inmunoglobulinas, las Anticalinas se pueden utilizar para identificar o unir estructuras moleculares. De una manera análoga a los anticuerpos, las estructuras flexibles de bucle se modifican; estas modificaciones permiten el reconocimiento de ligandos diferentes a los naturales.

30 El documento WO 01/04144 describe la generación artificial de un dominio de unión en la superficie de una proteína en proteínas estructurales de lámina beta per se, que carecen de un sitio de unión. Por medio de este dominio de unión artificial generado de nuevo, por ejemplo, se pueden obtener variaciones artificiales en γ -cristalina - una proteína estructural de la lente ocular - que interactúan con ligandos con alta afinidad y especificidad. En contraste con la modificación de sitios de unión que ya están presentes y se han formado a partir de estructuras flexibles de bucle, tal y como se ha mencionado anteriormente para las Anticalinas, estos dominios de unión se generan de novo en la superficie de láminas beta. Sin embargo, el documento WO 01/04144 solo describe la alteración de proteínas relativamente grandes para la generación de nuevas propiedades de unión. Debido a su tamaño, las proteínas de acuerdo con el documento WO 01/04144 pueden ser modificadas a nivel de ingeniería genética solo por métodos que requieren cierto esfuerzo. Además, en las proteínas descritas hasta ahora solo se ha modificado una proporción relativamente baja en porcentaje del total de aminoácidos, con el fin de mantener la estructura global de la proteína. Por lo tanto, solo está disponible una región relativamente pequeña de la superficie de la proteína, la cual se puede utilizar para la generación de propiedades de unión que no existían previamente. Por otra parte, el documento WO 01/04144 describe solamente la generación de una propiedad de unión para γ -cristalina.

35 El documento WO 04/106368 describe la generación de proteínas de unión artificiales basándose en proteínas de ubiquitina. La ubiquitina es una proteína pequeña, monómera y citosólica que está altamente conservada en su secuencia y está presente en todas las células eucariotas conocidas, desde protozoos hasta vertebrados. En el organismo desempeña un papel crucial en la regulación de la degradación controlada de proteínas celulares. Para este fin, las proteínas que se van a degradar se unen covalentemente a la ubiquitina o a cadenas de poliubiquitina durante su paso a través de una cascada enzimática y se degradan selectivamente debido a esta etiqueta. De acuerdo con recientes resultados, la ubiquitina o el etiquetado de proteínas a través de ubiquitina, respectivamente, tiene un papel importante también en otros procesos celulares, tales como la importación de varias proteínas o la regulación génica de las mismas.

Además de la aclaración de su función fisiológica, la ubiquitina es un objeto de la investigación, principalmente debi-

do a sus propiedades estructurales y proteoquímicas. La cadena polipeptídica de la ubiquitina consiste en 76 aminoácidos plegados en una estructura α/β extraordinariamente compacta (Vijay-Kumar, 1987): casi el 87% de la cadena polipeptídica está implicado en la formación de elementos estructurales secundarios por medio de enlaces de hidrógeno. Estructuras secundarias importantes son tres vueltas y media alfa-helicoidales, así como una lámina β antiparalela que consiste en cuatro hebras. La disposición característica de estos elementos - una lámina β antiparalela expuesta de la superficie de la proteína sobre cuyo lado posterior una hélice alfa está empaquetada, la cual se encuentra verticalmente en la parte superior de la misma - se considera generalmente como el denominado motivo de plegamiento de tipo ubiquitina. Una característica estructural adicional es una región hidrófoba pronunciada en el interior de la proteína entre la hélice alfa y la lámina β .

Debido a su pequeño tamaño, la preparación artificial de ubiquitina puede llevarse a cabo tanto por síntesis química como por medio de métodos biotecnológicos. Debido a las propiedades favorables del plegamiento, la ubiquitina se puede producir por ingeniería genética usando microorganismos tales como *Escherichia coli*, en cantidades relativamente elevadas, en el citosol o en el espacio periplásmico. Debido a las condiciones oxidantes que predominan en el periplasma, la última estrategia se reserva generalmente para la producción de proteínas secretoras. Debido a la preparación bacteriana sencilla y eficaz, la ubiquitina se puede utilizar como un ligando de fusión para preparar otras proteínas ajenas en las que la producción sea problemática. Por medio de la fusión a ubiquitina, se puede lograr una solubilidad mejorada y con ello una mejora del rendimiento de la producción.

En comparación con anticuerpos u otros armazones alternativos, las proteínas de unión artificiales que se basan en proteínas de ubiquitina (también conocidas como Affilin[®]) tienen las ventajas de tener pequeño tamaño y alta estabilidad, alta afinidad, alta especificidad, fabricación microbiana rentable y ajuste de la semivida en suero. Sin embargo, todavía hay una necesidad de desarrollar adicionalmente esas proteínas en términos de potencial inmunógeno, seguimiento rápido y predictivo del desarrollo preclínico y nuevos enfoques terapéuticos. Aunque el documento WO 04/106368 describe en general el uso de armazones de ubiquitina con el fin de obtener proteínas de unión artificiales, no se proporciona ninguna solución sobre cómo modificar y cómo seleccionar eficazmente una proteína ubiquitina modificada de este tipo, con el fin de obtener una afinidad de unión específica más elevada y específica a ligandos, tales como haptenos y antígenos, p. ej., proteínas y péptidos y epítomos de los mismos.

Los métodos descritos en el documento WO 05/05730 se refieren a monómeros de proteínas de ubiquitina modificadas o a proteínas acopladas de ubiquitina modificada. Las formas acopladas se generan por escrutinio y selección de una, dos o varias proteínas de ubiquitina modificadas y su combinación posterior por medio de métodos genéticos o químicos para obtener formas acopladas que permiten, por ejemplo, una unión multiespecífica de diferentes tipos de ligandos con una molécula de ubiquitina acoplada. En un ejemplo, el acoplamiento dirigido al sitio de dos proteínas idénticas basadas en ubiquitina (homodímeros) se describe para incrementar la afinidad de la unión en comparación con una sola molécula de ubiquitina modificada.

Es un objeto de la invención proporcionar un método de cómo identificar proteínas de ubiquitina multímeras con una capacidad de unión a un ligando elevada. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para identificar nuevas proteínas de unión basadas en ubiquitina modificada que son capaces de unirse específicamente con alta afinidad a ligandos seleccionados.

Los objetos descritos anteriormente se alcanzan mediante el contenido de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas de la invención se incluyen en las reivindicaciones dependientes así como en la siguiente descripción, ejemplos y figuras.

Compendio de la invención

Más específicamente, los inventores proporcionan un método para la identificación de una ubiquitina modificada heteromultímera con capacidad de unión a un ligando, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar una población de proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras procedente de proteínas de ubiquitina modificadas monómeras, comprendiendo dicha población proteínas heteromultímeras que comprenden dos o más monómeros de ubiquitina modificados de forma diferente o, al menos, un monómero de ubiquitina modificado unido entre sí en una disposición de cabeza a cola en la que al menos dos de cada uno de dichos monómeros de dicha proteína heteromultímera, se modifican de forma diferente al menos por sustituciones de los aminoácidos expuestos en la superficie, en al menos tres aminoácidos situados en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y 68 de SEQ ID NO: 1, teniendo dicha proteína monómera modificada una identidad de secuencia aminoacídica de al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% con la proteína ubiquitina no modificada;

b) proporcionar un ligando potencial a dicha población de proteínas modificadas de forma diferente;

c) poner en contacto dicha población de proteínas modificadas de forma diferente con dicho ligando;

d) identificar una proteína heteromultímera modificada por un proceso de escrutinio, en el que dicha proteína multímera modificada se une a dicho ligando con una afinidad de unión específica de K_d en un intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M y muestra una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando; y opcionalmente

e) aislar dicha proteína ubiquitina modificada heteromultímera con dicha afinidad de unión.

Definiciones de términos importantes empleados en la solicitud

La expresión "proteína ubiquitina" incluye la ubiquitina de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y modificaciones de la misma de acuerdo con la siguiente definición. La ubiquitina está altamente conservada en los organismos eucariotas. Por ejemplo, en todos los mamíferos investigados hasta la fecha, la ubiquitina tiene la secuencia de aminoácidos idéntica. Se prefieren particularmente las moléculas de ubiquitina procedentes de seres humanos, roedores, cerdos y primates. Además, se puede utilizar la ubiquitina procedente de cualquier otra fuente eucariota. Por ejemplo, la ubiquitina de levadura difiere solamente en tres aminoácidos de la secuencia de SEQ ID NO: 1. Generalmente, las proteínas de ubiquitina incluidas en dicha expresión "proteína ubiquitina" muestran una identidad de aminoácidos superior al 70%, preferiblemente más de 75% o más de 80%, más de 85%, más de 90%, más de 95%, más de 96% o hasta una identidad de secuencia del 97% con SEQ ID NO: 1.

Para determinar el grado de identidad de la secuencia de un derivado de la ubiquitina con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, se puede utilizar, por ejemplo, el programa de similitud local SIM (Xiaoquin Huang y Webb Miller, "Advances in Applied Mathematics", vol. 12: 337-357, 1991) o Clustal, W. (Thompson et al., Nucleic Acids Res., 22(22): 4673-4680, 1994).

Preferiblemente, el grado de identidad de la secuencia de la proteína modificada con SEQ ID NO: 1 se determina en relación con la secuencia completa de SEQ ID NO: 1.

En la presente memoria descriptiva, los términos "ligando" y "diana" y "pareja de unión" se utilizan como sinónimos y se pueden intercambiar. Un ligando es cualquier molécula capaz de unirse con una afinidad tal como se define en el presente documento, a la proteína ubiquitina modificada heteromultímera.

La "proteína de fusión heteromultímera" o "proteína heteromultímera" de la invención se considera una proteína que comprende una o varias proteínas de ubiquitina monómeras modificadas de forma diferente. Un "heteromultímero" de la invención se considera, por lo tanto, como una fusión de al menos dos proteínas de ubiquitina monómeras modificadas de forma diferente, con dos regiones del dominio de unión que interactúan proporcionando juntas una propiedad de unión monovalente para una pareja de unión específica. Se prefieren los heterodímeros o heterotrímeros.

De acuerdo con la invención, al menos dos monómeros de ubiquitina modificados de forma diferente que se unen a un ligando, se tienen que unir entre sí mediante fusión de cabeza a cola utilizando, p. ej., métodos genéticos. Los monómeros de ubiquitina fusionados modificados de forma diferente se unen de una forma monovalente y solo son eficaces si las dos regiones del dominio de unión ("BDR") actúan juntas. Los monómeros de ubiquitina modificados y enlazados que forman la proteína heterómera se unen al mismo epítipo a través de una única región de unión contigua. Esta región contigua del heterómero se forma a través de ambas regiones determinantes de la unión de al menos dos módulos formados por al menos dos monómeros de ubiquitina modificadas de forma diferente.

Una "fusión de cabeza a cola" se debe entender como la fusión de dos o más proteínas entre sí, enlazándolas en la dirección N-C-N-C- en función del número de unidades contenidas en el multímero. En esta fusión de cabeza a cola, los monómeros de ubiquitina se pueden conectar directamente sin ningún enlazador. Alternativamente, la fusión de los monómeros de ubiquitina se puede realizar a través de enlazadores, por ejemplo, un enlazador que tiene al menos la secuencia de aminoácidos GIG o que tiene al menos la secuencia de aminoácidos SGGGG o cualquier otro enlazador, por ejemplo GIG, SGGGG, SGGGGIG, SGGGSSGGGGIG o SGGGSSGGGG. También otros enlazadores para la fusión genética de dos monómeros de ubiquitina son conocidos en la técnica y se pueden utilizar. Resumiendo, las proteínas de ubiquitina no modificadas heteromultímeras son proporcionados por una fusión de dos, tres o más proteínas de ubiquitina monómeras modificadas de forma diferente con el fin de obtener una proteína de fusión de monómeros de ubiquitina modificados. En otra realización, al menos uno de los monómeros de ubiquitina no está modificado mientras que al menos una de las otras moléculas de ubiquitina está modificada.

El término "población" se refiere a una genoteca que es una mezcla de polipéptidos heterogéneos codificadas por ácidos nucleicos heterogéneos. La genoteca está compuesta por miembros que tienen un único polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico. Las diferencias en la secuencia entre los miembros de la genoteca son responsables de la diversidad presente en la genoteca. La genoteca puede estar en forma de una simple mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformados con una genoteca de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene solo un miembro de la genoteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, con el fin de permitir la producción de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una genoteca puede tener forma de una población de organismos hospedadores, conteniendo cada organismo una o varias copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la genoteca en forma de ácido nucleico que se puede expresar para producir su correspondiente miembro polipeptídico. Por lo tanto, la población de organismos hospedadores tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes polipeptídicas genéticamente diversas.

Dicha población de proteínas de ubiquitina heteromultímeras se proporciona, por ejemplo, mediante la fusión genéti-

ca de genotecas de ADN codificando cada una proteínas monómeras modificadas de forma diferente, o, en una versión alternativa, en donde al menos una de dichas proteínas de ubiquitina monómeras se modifica, traduciendo el ADN en proteínas de fusión heteromultímeras, mostrando dichas proteínas y escrutando las proteínas mostradas en presencia de proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas que comprenden proteínas de ubiquitina monómeras que están unidas entre sí en una disposición de cabeza a cola, en donde dichas proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras se unen a dicho ligando con una afinidad de unión específica de K_d en un intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M y muestran una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando. Con el fin de obtener una proteína ubiquitina heterodímera, dos genotecas de ADN, en donde cada una o al menos una codifica una proteína monómera modificada de forma diferente, se fusionan con el fin de obtener una proteína ubiquitina heterotrímera, tres genotecas de ADN en donde cada una o al menos una codifica una proteína monómera modificada de forma diferente se fusionan, etc. Otras alternativas se pueden utilizar para proporcionar genotecas para el escrutinio. Un ejemplo es la síntesis química de las proteínas, por ejemplo, mediante tecnología en estado sólido y la introducción de variaciones en su composición de aminoácidos. Otras opciones pueden ser consideradas y ser útiles para el experto en la materia. Por lo tanto, la invención no debe entenderse como que está limitada a los ejemplos descritos en el presente documento.

La invención describe por tanto un método por el cual se proporciona un repertorio de polipéptidos, de acuerdo con la funcionalidad tal y como se determina por la capacidad de unirse a un ligando, y un subgrupo de polipéptidos obtenidos como resultado de una selección se emplea a continuación para nuevas rondas de selección de acuerdo con la capacidad para unirse al ligando diana, con el fin de acumular y aumentar la afinidad de la unión al ligando.

La invención permite que la persona experta en la técnica elimine, a partir de un repertorio de polipéptidos seleccionados, aquellos polipéptidos que son incapaces de unirse al ligando diana con la afinidad especificada en las reivindicaciones. La invención permite que la persona experta en la técnica incremente un repertorio de polipéptidos seleccionados en relación con los polipéptidos que son funcionales y cumplen con los requisitos de afinidad.

Uno de los puntos clave más importantes de la invención reside en la selección de proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas con afinidad de unión monovalente con respecto a la diana y la posterior determinación de los aminoácidos modificados responsables de la afinidad de la unión.

Una ventaja adicional de la multimerización, preferiblemente dimerización, radica en el incremento del número de residuos de aminoácidos que se puede modificar para generar una nueva propiedad de unión de alta afinidad. La ventaja es que, aunque se modifican incluso más aminoácidos, la integridad proteoquímica se conserva sin disminuir la estabilidad global del armazón de dicha proteína de unión recién creada frente a una diana. Por un lado se incrementa el número total de residuos que se pueden modificar con el fin de generar un nuevo sitio de unión para una diana dada, ya que los residuos modificados se pueden distribuir en dos o tres o más proteínas de ubiquitina monómeras. El número de modificaciones puede que sea de este modo dos veces o x veces, correspondiéndose con el número de moléculas de ubiquitina monómeras modificadas. Resumiendo, una estructura modular de la proteína de unión basada en ubiquitina permite aumentar el número total de aminoácidos modificados ya que dichos aminoácidos modificados se incluyen en dos o tres o más moléculas de ubiquitina monómeras. El presente método proporciona la identificación de moléculas de ubiquitina heteromultímeras que tienen una especificidad monovalente (para un único epítipo).

"Monovalente" se entiende como la capacidad de que ambas regiones de unión creadas en la primera y la segunda (y opcionalmente más) unidad monómera de la ubiquitina dímera (opcionalmente trímera o en general multímera) modificada, juntas se unan a ED-B de una forma sinérgica y combinada, es decir, ambas regiones de unión actúan juntas para formar una actividad de unión monovalente. Tomando por separado cada región de unión tanto de la primera como de la segunda ubiquitina modificada en dicha molécula heterodímera, aparentemente ED-B se unirá con una eficiencia y una afinidad mucho menores que a la molécula dímera. Ambas regiones de unión forman un sitio de unión único que se forma como una región contigua de aminoácidos en la superficie de la proteína ubiquitina modificada heterodímera, de manera que dicha ubiquitina modificada es capaz para unirse de forma mucho más eficaz a ED-B que cada proteína monómera aislada. Es particularmente importante que según la presente invención, las dos proteínas monómeras no se unan entre sí después de haber escrutado las moléculas de ubiquitina con unión más potente, sino que el proceso de escrutinio ya se lleve a cabo en presencia de las ubiquitinas heterodímeras. Después de haber recibido la información de la secuencia sobre las moléculas de ubiquitina con unión más potente, estas moléculas se pueden obtener por cualquier otro método, por ejemplo, por síntesis química o por métodos de ingeniería genética, por ejemplo, enlazando entre sí las dos unidades monómeras de ubiquitina ya identificadas. Es de entender que todos los ejemplos proporcionados en este documento para proteínas de ubiquitina modificadas dímeras también se pueden modificar para una proteína ubiquitina modificada trímera o en general multímera.

Por lo tanto, el uso de heteromultímeros, en particular heterodímeros, que tienen un sitio de unión común a los ligandos, permite la posibilidad de introducir un mayor número de residuos modificados que no influyen indebidamente en la integridad proteoquímica de la molécula de unión final, ya que la cantidad total de esos residuos modificados se distribuye en dos o más unidades monómeras que están formando el dímero o el multímero. Dichas proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras están presentes en un banco de proteínas.

Después de haber establecido, por ejemplo, al menos dos genotecas de ADN diferentes que codifican proteínas de

ubiquitina modificadas monómeras mediante la modificación diferente de codones seleccionados en cada una de las unidades monómeras de ubiquitina, estas genotecas se fusionan genéticamente para obtener moléculas de ADN que codifican proteínas de ubiquitina modificadas, heteromultímeras. El ADN de estas genotecas se traduce en proteínas y las proteínas heteromultímeras modificadas obtenidas de ese modo, se ponen en contacto de acuerdo con la invención, con una molécula diana para permitir la unión de los ligandos entre sí, si existe una afinidad de unión. La ubiquitina modificada preferida es un heterodímero.

Un aspecto crucial de la invención es que el procedimiento de puesta en contacto y de escrutinio se llevan a cabo ya con respecto a la proteína de ubiquitina modificada heteromultímera, por ejemplo, heterodímera. Este procedimiento permite escrutar aquellas proteínas de ubiquitina que proporcionan una actividad de unión monovalente a la diana.

Es particularmente importante que, de acuerdo con la presente invención, las proteínas de ubiquitina modificadas monómeras no se unan entre sí después de haber seleccionado mediante escrutinio las moléculas de ubiquitina con unión más potente, sino que el procedimiento de escrutinio ya se realice en presencia de las ubiquitinas heteromultímeras. Sin embargo, se ha de señalar que después de haber recibido la información de la secuencia sobre las moléculas de ubiquitina heteromultímeras con unión más potente, estas moléculas también se pueden obtener por cualquier otro método, por ejemplo, por síntesis química o por métodos de ingeniería genética, por ejemplo, ligando entre sí las unidades monómeras de ubiquitina modificadas de forma diferente ya identificadas, para formar una proteína de unión heterodímera.

La puesta en contacto de acuerdo con la invención se realiza preferiblemente por medio de una presentación adecuada y un método de selección, tal como la presentación en fagos, la presentación ribosómica, la presentación en fagos TAT, la presentación en ARNm o la presentación en la superficie celular, la presentación en la superficie de levaduras o métodos de presentación en superficie de bacterias, preferentemente por medio del método de presentación en ribosomas o fagos. Para una descripción completa, se hace referencia también a las siguientes referencias: Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), 572-579; Wells y Lowmann, Curr. Opin. Struct. Biol. 2 (1992), 597-604; Kay et al., "Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual" (1996), Academic Press. Los métodos mencionados anteriormente son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden utilizar de acuerdo con la invención, incluyendo modificaciones de los mismos.

La determinación de si la proteína modificada tiene una afinidad de unión cuantificable con respecto a un ligando predeterminado, se puede realizar de acuerdo con la invención preferiblemente mediante uno o varios de los siguientes métodos: ELISA, espectroscopía de resonancia de plasmón de superficie, cromatografía de exclusión por tamaño, anisotropía fluorescente, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría de valoración isotérmica y ultracentrifugación analítica. Otros métodos disponibles en la técnica también pueden ser utilizados por el experto dentro de su conocimiento general.

Un "heteromultímero" se considera como una proteína de la presente memoria que comprende al menos dos proteínas de ubiquitina monómeras diferentes. Los "heterodímeros" de la invención se consideran como una fusión de dos proteínas de ubiquitina monómeras modificadas de forma diferente. Ambas presentan una propiedad de unión monovalente combinada con el ligando específico. Se hace hincapié en que la proteína ubiquitina modificada multímera, p. ej., dímera que se une a un ligando de la invención no se obtiene mediante el escrutinio separado de cada proteína ubiquitina monómera y la combinación de al menos dos de ellas después, sino por el escrutinio de proteínas multímeras, opcionalmente dímeras, que consisten en una primera y una segunda o más unidades monómeras o que muestran juntas una actividad de unión monovalente a dicho ligando. Es de esperar que cada una de dichas subunidades muestre una afinidad de unión hacia el ligando bastante limitada, mientras que solo la proteína ubiquitina modificada multímera o dímera combinada tendrá las excelentes propiedades de unión descritas en el presente documento.

En una realización, el método se refiere a la identificación de una proteína ubiquitina heterodímera modificada en la que dos unidades de ubiquitina monómeras están unidas entre sí en una disposición de cabeza a cola, en donde cada monómero de dicha proteína dímera se modifica de forma diferente mediante sustituciones de al menos 3, preferiblemente al menos 6 aminoácidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y 68 de SEQ ID NO: 1 (estando cada uno de ellos expuesto en la superficie) en donde dichas sustituciones comprenden

(1) en las primeras sustituciones de unidades monómeras, al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 63, 64, 65 y 66; y

en las segundas sustituciones de unidades monómeras al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 62, 63, 64, 65 y 66; opcionalmente, además, en la posición del aminoácido 2, o

(2) en las primeras sustituciones de unidades monómeras, al menos en las posiciones de aminoácidos 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 y 66; y

en las segundas sustituciones de unidades monómeras, al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 62, 63, 64, 65 y 66; opcionalmente, además, en la posición del aminoácido 2,

y, opcionalmente, otras modificaciones, preferiblemente sustituciones de otros aminoácidos, teniendo dicha unidad

monómera de ubiquitina modificada una identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 de al menos una entre el grupo de 80%, al menos 83%, al menos 85%, al menos 83% y al menos 90%, teniendo dicha proteína una afinidad de unión específica a un ligando de $K_d = 10^{-7} - 10^{-12}$ M y que muestra una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando.

- 5 En otras realizaciones de la invención, 6, 7, 8, 9 o todos los aminoácidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y 68 de SEQ ID NO: 1 están modificados en cada unidad monómera de ubiquitina. Se debe entender que la presente invención permite una combinación de cada una de estas variaciones en cada una de las unidades monómeras, por ejemplo, en la primera y la segunda unidad. Por ejemplo, la primera unidad monómera puede comprender 6 modificaciones mientras que la segunda unidad comprende 7 u 8 modificaciones, la primera unidad puede comprender 8 modificaciones y la segunda unidad 7 modificaciones, etc. Cada uno de los aminoácidos mencionados anteriormente se puede seleccionar en la primera y en la segunda unidad y, a continuación, ambas unidades se combinan.

Descripción detallada de la invención

Métodos de presentación de las proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras

- 15 Los procedimientos de presentación en fagos y ribosomas adaptados a esta solicitud se describen a continuación y en los Ejemplos. Se describen como ejemplos de un procedimiento de selección de acuerdo con la invención para detectar variaciones de ubiquitina que muestran las propiedades de unión a un ligando potencial, tal y como se describe en el presente documento. De la misma manera, por ejemplo, se pueden aplicar métodos para la presentación en bacterias (presentación en la superficie bacteriana; Daugherty et al., 1998, Protein Eng. 11(9):825-832) o en células de levadura (presentación en la superficie de levaduras; Kieke et al., 1997 Protein Eng. 10(11):1303-10) o en sistemas de selección sin células, tales como la presentación en ribosomas (Hanes y Plückthun, 1997 Proc Natl Acad Sci USA. 94(10):4937-4942; He y Taussig, 1997_ Nucleic Acids Res analytical ultracentrifugation, 25(24):5132-5134) o la presentación en cis (Odegrip et al., 2004 Proc Natl Acad Sci USA. 101(9):2806-2810) o la presentación en ARNm. En este último caso se consigue una ligación física transitoria del genotipo y fenotipo mediante el acoplamiento de la variación proteica con el ARNm apropiado a través del ribosoma.

- En el procedimiento de presentación en fagos descrito en la presente memoria, variaciones recombinantes de ubiquitina se presentan sobre un fago filamentoso, mientras que el ADN que codifica la variación presentada está presente al mismo tiempo, empaquetado en forma de cadena sencilla en la cubierta del fago. Por lo tanto, en el marco de un enriquecimiento de la afinidad, se pueden seleccionar variaciones que tienen ciertas propiedades, a partir de una genoteca y su información genética se puede amplificar mediante la infección de bacterias adecuadas o la adición de otro ciclo de enriquecimiento, respectivamente. La presentación de la ubiquitina mutada en la superficie de fagos se consigue mediante la fusión genética con una secuencia señal amino-terminal - preferiblemente la secuencia señal PelB - y una proteína de la cápsida o de la superficie del fago - se prefiere la fusión carboxiterminal con la proteína pIII de la cápsida o con un fragmento de la misma. Además, la proteína de fusión codificada puede contener elementos funcionales adicionales, tales como, por ejemplo, un marcador de la afinidad o un epítipo de anticuerpo para la detección y/o purificación mediante cromatografía de afinidad o una secuencia de reconocimiento para una proteasa para la escisión específica de la proteína de fusión en el transcurso del enriquecimiento de la afinidad. Además, un codón de parada ámbar puede estar presente, por ejemplo, entre el gen de la variación de ubiquitina y la región codificadora de la proteína de la cápsida del fago o el fragmento de la misma que no es reconocido durante la traducción en una cepa supresora adecuada, debido parcialmente a la introducción de un aminoácido.

- El vector bacteriano adecuado para el procedimiento de selección en el contexto del aislamiento de variaciones de ubiquitina con propiedades de unión a una diana determinada y en el que se inserta el casete génico para la proteína de fusión descrita, se conoce como fagémido. Entre otras, contiene la región intergénica de un fago filamentoso (por ejemplo, M13 o f1) o una porción de la misma, la cual en el caso de una superinfección de la célula bacteriana portadora del fagémido por medio de fagos auxiliares tales como, por ejemplo, M13K07, da como resultado el empaquetamiento de una hebra covalentemente cerrada de ADN del fagémido en una cápsida del fago. Las partículas de fago generadas de esta manera son secretadas por la bacteria y presentan la variación de ubiquitina respectiva codificada en su superficie debido a su fusión con la proteína de la cápsida pIII o un fragmento de la misma, en su superficie. Proteínas de la cápsida pIII naturales están presentes en la partícula de fago de manera que se conserva su capacidad para volver a infectar cepas bacterianas adecuadas y por lo tanto la posibilidad de amplificar el ADN correspondiente. Por lo tanto, se garantiza la ligación física entre el fenotipo de la variación de ubiquitina - es decir su propiedad de unión potencial - y su genotipo.

- Las partículas de fago obtenidas se pueden seleccionar con respecto a la unión de la variación de ubiquitina presentada a cualquier diana, por ejemplo, ED-B, TNFalfa, MIA-2, NGF, IgG u otras dianas, por medio de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para este fin, las variaciones de ubiquitina presentadas se pueden inmovilizar transitoriamente para dirigirse a una sustancia unida, por ejemplo, sobre placas de microtitulación y se pueden eluir específicamente después de que se separan las variaciones no unidas. La elución se realiza preferiblemente mediante soluciones básicas tales como, p. ej., trietilamina 100 mM. Alternativamente, la elución se puede realizar en condiciones ácidas, por proteólisis o adición directa de bacterias infectadas. Las partículas de fago obtenidas de esta manera se pueden volver a amplificar y enriquecer mediante ciclos sucesivos de selección y amplificación de varian-

tes de ubiquitina con propiedades de unión a, por ejemplo, ED-B, TNFalfa, MIA-2, NGF, IgG o cualquier otra diana.

Una variación de la presentación en fagos es la técnica de presentación en fagos Tat (Paschke, M. y W. Hohne (2005). Gene 350(1): 79-88; véase también el documento EP 1567643). Con este método la variante de ubiquitina que está codificada por el fagémido, es secretada a través del sistema de translocación de argininas gemelas (Tat) que exporta proteínas plegadas que ya han alcanzado su conformación natural en el citoplasma (Brüser 2007 Appl Microbiol Biotechnol 76(1): 35-45). Un requisito para la secreción es la fusión de un péptido señal N-terminal específico que dirige la variante de ubiquitina hacia el poro Tat. Después de entrar en el espacio periplásmico, el péptido señal N-terminal es eliminado por una peptidasa señal. En el espacio periplásmico la variante de ubiquitina se une entonces covalentemente a la proteína de la cápsida pIII o a un fragmento C-terminal de la misma que es secretado desde el citoplasma a través de la ruta Sec, así como también otras proteínas de fagos. Esta ligación entre la ubiquitina y pIII se realiza por la interacción de alta afinidad de la cremallera de leucina Jun en el extremo N-terminal de la proteína pIII y la cremallera de leucina Fos en el extremo C-terminal de la variante de ubiquitina. Cisteínas adicionales en los extremos N y C-terminales de cada una de las cremalleras de leucina, permiten un enlace covalente entre ambas proteínas y, como consecuencia, también permiten un enlace covalente entre la ubiquitina presentada y su producto génico codificado dentro de la partícula del fago.

Una caracterización adicional de las variaciones de ubiquitina obtenidas de esta manera se puede realizar cuando todavía están en la forma de fagémido, es decir, fusionadas con el fago, o después de la clonación con el casete génico correspondiente en un vector de expresión adecuado, en forma de proteína soluble. Los métodos apropiados son conocidos para los expertos en la técnica o se describen en la bibliografía. La caracterización puede comprender, por ejemplo, la determinación de la secuencia de ADN y por lo tanto de la secuencia primaria de las variaciones aisladas. Además, la afinidad y la especificidad de las variaciones aisladas se pueden detectar, por ejemplo, por medio de métodos bioquímicos convencionales tales como ELISA o resonancia de plasmón superficial, cromatografía de exclusión por tamaño, anisotropía de fluorescencia, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría de valoración isotérmica o ultracentrifugación analítica. Considerando el análisis de la estabilidad, por ejemplo, métodos espectroscópicos en relación con una falta de plegamiento químico o físico son conocidos por los expertos en la técnica. Otros métodos bien conocidos son la espectroscopía de CD, la espectroscopia de fluorescencia de proteínas y la espectroscopía de RMN.

En una realización adicional de la invención, se preparan variaciones de ubiquitina por el procedimiento de presentación en ribosomas por medio de un sistema de transcripción/traducción exento de células y se presentan como un complejo con el ARNm correspondiente, así como el ribosoma. Para este fin, se utiliza una genoteca de ADN, tal y como se ha descrito anteriormente, como una base en la que los genes de las variaciones están presentes en forma de fusiones con las correspondientes secuencias reguladoras para la expresión y la biosíntesis de proteínas. Debido a la delección del codón de parada en el extremo 3' de la genoteca, así como a condiciones experimentales adecuadas (baja temperatura, alta concentración de Mg^{2+}) el complejo ternario que consiste en la proteína naciente, el ARNm y el ribosoma, se conserva durante la transcripción/traducción *in vitro*.

Después de establecer un banco de proteínas que contiene proteínas de ubiquitina modificadas heterodímeras mediante la modificación de forma diferente de los aminoácidos seleccionados en cada una de las unidades monómeras de ubiquitina, las proteínas dímeras modificadas se ponen en contacto de acuerdo con la invención con la diana para permitir la unión de los ligandos entre sí, si existe una afinidad de unión. Estos bancos de proteínas pueden estar en forma de un banco con método de presentación, presentando o empleando cualquier otro método de presentación de las proteínas modificadas, de forma que se permite el contacto entre las proteínas modificadas y la proteína diana, en donde dicho método de presentación es opcionalmente un método de presentación en fagos, presentación ribosómica, presentación en fagos TAT, presentación en la superficie celular, presentación en levaduras, presentación bacteriana o presentación en ARNm.

45 **Ligandos y dianas potenciales de las proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras**

La presente invención se ha establecido con éxito con los siguientes antígenos representativos: ED-B, TNF-alfa, MIA-2, NGF e IgG. Se debe entender que estos antígenos solo se han seleccionado para mostrar que los métodos actualmente descritos se pueden llevar a cabo con éxito por una persona experta en la técnica sin una carga indebida después de haber recibido la información proporcionada en el presente documento. La invención no se limita a estos antígenos específicos, sino que se puede realizar con todos o con al menos la mayoría de los ligandos y moléculas diana conocidos en la técnica. Esas dianas pueden ser seleccionadas por el experto en la materia partiendo de su conocimiento general de la técnica. A continuación, se proporcionan las definiciones generales de los ligandos y dianas, así como de los antígenos y haptenos y se proporcionan también ejemplos seleccionados de otras posibles moléculas diana.

Según la invención, antígeno se referirá a una sustancia capaz de unirse a través de la ubiquitina modificada descrita ahora, cuya función es comparable a la de un anticuerpo. Términos alternativos utilizados en el presente documento son "ligandos", "pareja de unión" o "diana". Las proteínas de ubiquitina modificadas de la invención proporcionan moléculas de unión que actúan de una manera similar a un anticuerpo, evitando al mismo tiempo sus desventajas. El término antígeno comprende haptenos, péptidos, proteínas, azúcares, ADN, etc. En el diccionario médico "Roche Lexikon Medizin" (4ª edición; Urban & Fischer/Elsevier GmbH) se pueden obtener las siguientes definiciones

de antígeno y hapteno que también se utilizan en la presente descripción:

Antígeno (AG): Denominación para cualquier sustancia reconocida como extraña ("no propia") por el sistema inmune. Inicia en la mayoría de casos una reacción inmune que conduce a inmunidad (= "inmunógeno"); en el caso de alergia (= "alérgeno") y atopía ("atopígeno"), respectivamente, esta reacción inmune está exagerada. El AG induce una reacción de defensa humoral (reacción antígeno-anticuerpo) y/o celular (véase más abajo inmunidad). Si el AG es tolerado por el sistema inmune (tolerancia inmune) también se conoce como "tolerógeno". Son eficaces como antígeno principalmente sustancias complejas y de mayor peso molecular (cuerpos proteicos, polisacáridos, nucleótidos y muchos compuestos sintéticos) que tienen funcionalidades químicamente identificables (determinantes) responsables de la respuesta inmune. Se clasifican como 1) AG completo, la mayoría de peso molecular más alto y capaz de provocar una respuesta inmune por sí mismo, 2) hapteno de bajo peso molecular (= medio antígeno) que actúa como inmunógeno solo después de estar acoplado con una molécula portadora más grande. Referido, por ejemplo como AG autólogo xenogénico, alogénico o isogénico; auto-AG, hetero-AG, de trasplante, AG anti-virus tumoral.

Hapteno: compuesto químico simple, de bajo peso molecular responsable de la especificidad de un antígeno (AG) o con capacidad de unión específica del anticuerpo debido a su estructura (determinante), respectivamente, pero incapaz de generar una alergia en contraste con un AG completo. Se convierte en un antígeno completo después de la unión a un cuerpo proteico denominado vehículo.

Un "ligando" o "diana" o "pareja de unión" es una molécula que es reconocida por las proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas, descritas en breve. Ejemplos de ligandos que se pueden emplear en la práctica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agonistas y antagonistas de receptores de la membrana celular, toxinas y venenos, epítopos víricos, hormonas, receptores hormonales, polipéptidos, péptidos, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores, fármacos (por ejemplo, opiáceos, esteroides, etc.), lectinas, azúcares, polinucleótidos, ácidos nucleicos, oligosacáridos, proteínas y anticuerpos monoclonales.

Resumiendo, como pareja de unión para las proteínas modificadas proporcionadas de acuerdo con la invención, se pueden emplear todas las moléculas pertinentes biológica y médicamente activas. Las posibles parejas de unión se describirán a continuación a modo de ejemplo. Cabe señalar, sin embargo, que se puede añadir a esta lista una pluralidad de otros posibles ligandos. Al igual que la relación entre el anticuerpo y el antígeno, la lista de ligandos potenciales se puede completar con otros ligandos potenciales.

En esta invención, ejemplos de ligandos de ubiquitinas heterodímeras son el dominio extra B de la fibronectina (ED-B), una citocina (factor de necrosis tumoral alfa) (TNF- α), MIA-2, una inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo, un anticuerpo completo, (por ejemplo, inmunoglobulina G), y un factor de crecimiento (por ejemplo, NGF, por ejemplo, factor de crecimiento nervioso humano). A continuación se ofrece una breve descripción de estos ligandos. Sin embargo, se hace hincapié en que todos estos ligandos son bien conocidos en la técnica desde hace años y son conocidos por los expertos en las respectivas áreas técnicas. Por lo tanto, las siguientes descripciones son solo breves resúmenes de algunos parámetros importantes de estas proteínas de las que también se conocen las secuencias de aminoácidos.

El dominio extra B (ED-B) de la fibronectina es un pequeño dominio que se inserta por corte y empalme alternativo del transcrito primario de ARN en la molécula de fibronectina. ED-B se sabe que está involucrado en el cáncer y en la psoriasis. Sorprendentemente, se detectaron altos niveles de expresión de ED-B en lesiones primarias así como en sitios de metástasis de casi todas las clases de cánceres sólidos humanos, incluyendo cáncer de mama, colorrectal, de pulmón de células no pequeñas, de páncreas, hepatocelular, de cabeza y cuello y de piel humana, así como meningioma intracraneal y glioblastoma. (Menrad y Menssen, 2005). Además, ED-B se puede unir a agentes de diagnóstico y se puede utilizar favorablemente como herramienta de diagnóstico. Un ejemplo es su uso en la formación de imágenes moleculares, por ejemplo, de placas ateroscleróticas y detección de cáncer, por ejemplo, mediante inmunogammagrafía de pacientes con cáncer. Son posibles bastantes otros usos de diagnóstico.

La secuencia aminoacídica de 91 aminoácidos del dominio extra B humano (ED-B) de la fibronectina se muestra en SEQ ID NO: 2. Para la expresión de la proteína, se tiene que añadir una metionina inicial. ED-B se conserva en mamíferos, por ejemplo, en roedores, ganado, primates, carnívoros, seres humanos, etc. Ejemplos de animales en los que hay un 100% de identidad de secuencia con ED-B humano son *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Equus caballus*, *Macaca mulatta*, *Canis lupus familiaris* y *Pan troglodytes*.

La proteína MIA (actividad inhibidora de melanoma, del inglés "melanoma inhibitory activity", también denominada CD-RAP, proteína sensible al ácido retinoico derivada del cartílago, del inglés "cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein") se expresa en los condrocitos y se aisló originalmente debido a sus propiedades anti-proliferativas *in vitro*. Originalmente se detectó en material sobrenadante de cultivos celulares de células de melanoma y se aisló a partir de ahí. Después de la purificación y una secuenciación parcial de la proteína, se aisló un fragmento de ADNc de MIA humana con la ayuda de cebadores degenerados y RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Ahora se conocen las secuencias de MIA de ser humano, murino, bovino, rata y pez cebra. Una proteína relacionada, MIA-2 se describe en los documentos EP1410803B1 y US-2010/0212037. Estos documentos se incorporan en esta memoria como referencia.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), una citocina pleiotrópica, es producido principalmente por macrófagos, pero otros tipos de células también lo producen. TNF-alfa muestra actividades patológicas así como beneficiosas. Tiene efectos estimulantes sobre el crecimiento y propiedades inhibitoras del crecimiento, además de tener autorregulación. Las funciones beneficiosas de TNF-alfa incluyen mantener la homeostasis mediante regulación del ritmo circadiano corporal, iniciar una respuesta inmune frente a infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias, sustituir o remodelar tejido dañado mediante la estimulación del crecimiento de fibroblastos y, como su nombre indica, destruir ciertos tumores. TNF-alfa ha sido implicado como mediador en una gran variedad de enfermedades.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que se descubrió hace más de 50 años como una molécula que favorece la supervivencia y la diferenciación de neuronas sensoriales y simpáticas. NGF es un miembro de una familia de factores neurotróficos conocidos como neurotrofinas. El NGF se une con alta afinidad a una cinasa del receptor de tropomiosina conocida como TrkA. El NGF también es capaz de unirse a un receptor conocido como p75, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, que también interacciona con otras neurotrofinas. La cadena beta de NGF es la única responsable de la actividad estimuladora del crecimiento nervioso de NGF. La cadena beta se homodimeriza y se incorpora en un complejo proteico más grande. La estructura y la función de NGF se revisa, por ejemplo, en Sofroniew, M.V. et al. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1217-1281; Weismann, C. y de Vos, A.M. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* 58:748-759; Fahnstock, M. (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 165:1-26.

Los anticuerpos IgG son moléculas grandes de aproximadamente 150 kDa compuestos por 4 cadenas peptídicas. Contiene 2 cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 50 kDa y 2 cadenas ligeras idénticas de aproximadamente 25 kDa, por ello una estructura cuaternaria tetrámera. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí y con una cadena ligera, cada una con enlaces disulfuro. El tetrámero resultante tiene dos mitades idénticas que forman juntas la forma similar a una Y. Cada extremo del tenedor contiene un sitio idéntico de unión a antígeno. Las regiones Fc de las IgGs tienen un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Los N-glicanos fijados a este sitio son predominantemente estructuras dianténarias fucosiladas en el núcleo de tipo complejo. Además, pequeñas cantidades de estos N-glicanos también son portadoras de GlcNAc biseccionado y residuos de ácido siálico ligados en α -2,6.

Métodos de selección, enriquecimiento y caracterización de las proteínas presentadas

La selección de las ubiquitinas modificadas heteromultímeras con respecto a sus actividades de unión a un ligando dado, con una afinidad de unión específica de Kd en un intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M, se puede realizar por medio de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para este fin, variaciones de ubiquitina presentadas, por ejemplo, en los complejos ribosómicos se pueden inmovilizar transitoriamente con una sustancia diana unida, por ejemplo, a placas de microtitulación o se pueden unir a partículas magnéticas después de la unión en solución, respectivamente. Después de la separación de las variaciones no unidas, la información genética de las variaciones con actividad de unión se puede eluir específicamente en forma de ARNm mediante la destrucción del complejo ribosómico. La elución se lleva a cabo preferiblemente con EDTA. El ARNm obtenido de esta manera se puede aislar y transcribir de forma inversa en ADN usando métodos adecuados (reacción de la transcriptasa inversa), y el ADN obtenido de esta manera se puede volver a amplificar.

Por medio de ciclos sucesivos de transcripción/traducción *in vitro*, selección y amplificación, las variaciones de ubiquitina con propiedades de unión a un hapteno o antígeno predeterminado, se pueden enriquecer.

La caracterización adicional de las variaciones de ubiquitina obtenidas de esta manera se puede realizar en forma de una proteína soluble tal y como se ha detallado más arriba, después de la clonación del casete génico correspondiente en un vector de expresión adecuado. Los métodos apropiados son conocidos para los expertos en la técnica o están descritos en la bibliografía.

Preferiblemente, a la etapa de detección de las proteínas que tienen una afinidad de unión con respecto a un ligando predeterminado, sigue una etapa de aislamiento y/o enriquecimiento de la proteína detectada.

Después de la expresión de la proteína ubiquitina modificada de acuerdo con la invención, se puede purificar y enriquecer adicionalmente por métodos conocidos per se. Los métodos seleccionados dependen de varios factores conocidos per se por los expertos en la técnica, por ejemplo, el vector de expresión utilizado, el organismo hospedador, el campo de uso previsto, el tamaño de la proteína y otros factores. Para una purificación simplificada, la proteína modificada de acuerdo con la invención se puede fusionar con otras secuencias peptídicas que tienen una mayor afinidad hacia materiales de separación. Preferiblemente, tales fusiones se seleccionan de modo que no tengan un efecto perjudicial sobre la funcionalidad de la proteína ubiquitina o se puedan separar después de la purificación, debido a la introducción de sitios específicos de escisión para proteasa. Tales métodos también son conocidos per se por los expertos en la técnica.

Proteínas de ubiquitina no modificadas y modificadas como punto de partida para la mutagénesis

Las expresiones "proteína capaz de unirse" o "proteína de unión" se refieren a una proteína ubiquitina que comprende una región de unión tal y como se define más adelante. La región de unión puede referirse al menos a dos regiones determinantes de la unión ("BDR"). Cada monómero tiene al menos una región determinante de la unión; al me-

nos dos monómeros forman un multímero que tiene al menos dos regiones determinantes de la unión que forman una región de unión frente a un antígeno. Cualquier proteína de unión de este tipo basada en ubiquitina puede comprender dominios proteicos adicionales que no son dominios de unión, tales como, por ejemplo, restos de multimerización, marcadores polipeptídicos, enlazadores polipeptídicos y/o moléculas de polímeros no proteicos. Algunos ejemplos de moléculas de polímeros no proteicos son almidón hidroxietílico, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquileo.

Una multimerización adicional de las proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras, también se puede realizar, por ejemplo, mediante una fusión posterior a la traducción de la proteína ubiquitina modificada heteromultímera con moléculas efectoras que tienen un dominio de multimerización (por ejemplo, TNF- α). En aún otra realización, una multimerización adicional se lleva a cabo mediante el uso de un enlazador de polietilenglicol (PEG). En aún otra realización adicional, dicho dominio de multimerización también actúa como componente farmacéuticamente activo; un ejemplo es TNF-alfa actuando como dominio de multimerización y como componente farmacéutico

Proteínas de ubiquitina modificadas heteromultímeras

La expresión "una proteína ubiquitina modificada" se refiere a modificaciones de la proteína ubiquitina a través de una cualquiera entre sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas, aunque las sustituciones son las modificaciones más preferidas que se pueden suplementar mediante una cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente. El número de modificaciones está estrictamente limitado ya que dichas unidades de ubiquitina monómeras modificadas tienen una identidad de aminoácidos con SEQ ID NO: 1 de al menos una entre el grupo de 80%, al menos 83%, al menos 85%, al menos 83% y al menos 90%. A lo sumo, el número total de aminoácidos modificados, preferiblemente sustituciones, en una unidad monómera está limitado por lo tanto a 15 aminoácidos, lo que corresponde a una identidad de aminoácidos del 80%. Otras alternativas son 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos modificados. El número total de aminoácidos modificados en la molécula de ubiquitina dímera, preferiblemente sustituciones, es de 30 aminoácidos que se corresponde con 20% de modificaciones de aminoácidos basadas en la proteína dímera. Otras alternativas son 28, 26, 24, 22, 20, 18, 16, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 aminoácidos modificados en la molécula de ubiquitina dímera. La identidad de aminoácidos de la proteína ubiquitina modificada dímera en comparación con una ubiquitina dímera que consiste en dos proteínas monómeras de ubiquitina no modificadas con una secuencia básica monómera de SEQ ID NO: 1, se selecciona entre al menos una del grupo de 80%, al menos 83%, al menos 85%, al menos 83% y al menos 90%.

Las proteínas de ubiquitina modificadas obtenidas por el método de la invención son proteínas recombinantes modificadas genéticamente con nuevas afinidades de unión hacia una molécula diana o un ligando o una molécula de unión (estas expresiones se utilizan de forma intercambiable en el presente documento).

El término "sustitución" también comprende la modificación química de aminoácidos, por ejemplo, mediante sustitución o adición de grupos químicos o de residuos respecto al aminoácido original. La sustitución de aminoácidos en al menos una región expuesta en la superficie de la proteína que comprende aminoácidos situados en al menos una hebra beta de la región de la lámina beta o posicionados hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra beta, es decisiva.

La modificación se realiza mediante métodos bien establecidos y bien conocidos en la técnica. Una "secuencia de nucleótidos o de aminoácidos modificada al azar" es una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que en una variedad de posiciones ha sido sometida a inserción, deleción o sustitución con nucleótidos o aminoácidos, cuya naturaleza no se puede predecir. En muchos casos las secuencias insertadas de nucleótidos aleatorios (aminoácidos) o de nucleótido (aminoácido) serán "completamente al azar" (por ejemplo, como consecuencia de una síntesis aleatoria o de mutagénesis mediada por PCR). Sin embargo, las secuencias aleatorias también pueden incluir secuencias que tienen una característica funcional común (por ejemplo, reactividad con un ligando del producto de expresión) o las secuencias aleatorias pueden ser al azar en el sentido de que el producto de expresión final tiene una secuencia completamente aleatoria, por ejemplo, con una distribución uniforme de los diferentes aminoácidos.

Con el fin de introducir adecuadamente los fragmentos aleatorios en los vectores, se prefiere de acuerdo con la invención, que los nucleótidos aleatorios se introduzcan en el vector de expresión según el principio de mutagénesis dirigida al sitio mediada por PCR. Sin embargo, otras opciones son conocidas por la persona experta en la técnica, y es posible insertar también, por ejemplo, genotecas de secuencias aleatorias sintéticas en los vectores.

Para generar mutantes o genotecas mediante PCR de fusión, por ejemplo, se pueden realizar tres reacciones de PCR. Dos reacciones de PCR se llevan a cabo para generar fragmentos intermedios que se solapan parcialmente. Una tercera reacción de PCR se lleva a cabo para fusionar los fragmentos intermedios.

El método para la construcción de la genoteca o de variantes mutantes puede incluir la construcción de un primer grupo de cebadores alrededor de un sitio de restricción deseado (cebador de sitio de restricción), un cebador de restricción directo e inverso y un segundo grupo de cebadores alrededor de, por ejemplo, aguas arriba y aguas abajo del codón de interés (los cebadores mutagénicos), un cebador mutagénico directo e inverso. En una realización, los cebadores se construyen inmediatamente aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, del codón de interés. Los cebadores de restricción y mutagénicos se utilizan para construir el primer fragmento intermedio y el segundo frag-

mento intermedio. Dos reacciones de PCR producen estos fragmentos intermedios lineales. Cada uno de estos fragmentos intermedios lineales comprende al menos un codón de interés mutado, una secuencia de nucleótidos so-
lapante y un sitio de digestión. La tercera reacción de PCR utiliza los dos fragmentos intermedios y los cebadores di-
rectos e inversos de restricción para producir un producto lineal fusionado. Por el contrario, en este caso los extre-
mos libres del producto lineal se digieren con una enzima de restricción para crear extremos cohesivos en el produc-
to lineal. Los extremos cohesivos del producto lineal se fusionan mediante el uso de una ligasa de ADN para produ-
cir un producto circular, por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos circular.

Para construir los fragmentos intermedios, se realiza el diseño y la síntesis de dos grupos de cebadores directos e
inversos, un primer grupo que contiene un sitio de digestión para enzimas de restricción junto con su secuencia de
nucleótidos flanqueante, y el segundo grupo que contiene al menos un codón de interés variante (cebadores mu-
tagénicos). Los expertos en la técnica reconocerán que el número de variantes dependerá del número de modifica-
ciones de aminoácidos variantes deseado. El inventor contempla que si se utilizan otras enzimas de restricción en el
procedimiento, la ubicación exacta de este sitio de digestión y la secuencia correspondiente de los cebadores direc-
tos e inversos, se pueden alterar en consecuencia. Otros métodos están disponibles en la técnica y se pueden utili-
zar en su lugar.

Aparte de tener el fragmento aleatorio del producto de expresión introducido en un armazón de acuerdo con la pre-
sente invención, frecuentemente es necesario acoplar la secuencia aleatoria a una pareja de fusión para tener la se-
cuencia de nucleótidos aleatorizada fusionada con una secuencia nucleotídica que codifica por lo menos una pareja
de fusión. Una pareja de fusión de este tipo puede facilitar, por ejemplo, la expresión y/o purificación/aislamiento y/o
una mayor estabilización del producto de expresión.

Para los fines de la purificación, la pareja de fusión puede incluir un marcador de la purificación tal como el marcador
His6, el marcador myc, una secuencia diana de biotinilación BSP, de BirA, el marcador flu, lacZ y GST. Además, la
pareja de fusión puede incluir una señal de clasificación o una secuencia de direccionamiento.

La sustitución de aminoácidos para la generación del nuevo dominio de unión específico de la molécula diana, pue-
de realizarse de acuerdo con la invención con cualquier aminoácido deseado, es decir, en la modificación para gene-
rar la nueva propiedad de unión con la molécula diana, no es obligatorio tener cuidado de que los aminoácidos ten-
gan una propiedad química particular o una cadena lateral, respectivamente, que sea similar a la de los aminoácidos
sustituídos, de manera que cualquier aminoácido deseado se puede utilizar para este propósito.

La etapa de modificación de los aminoácidos seleccionados se realiza de acuerdo con la invención, preferiblemente
por mutagénesis a nivel genético, preferiblemente por mutagénesis aleatoria, es decir, una sustitución aleatoria de
los aminoácidos seleccionados. Preferiblemente, la modificación de ubicuitina se realiza por medio de métodos de
ingeniería genética para alterar un ADN que pertenece a la proteína respectiva. Preferiblemente, la expresión de la
proteína ubicuitina se lleva a cabo a continuación en organismos procariotas o eucariotas.

Las sustituciones se llevan a cabo en particular en aminoácidos expuestos en la superficie de las cuatro hebras beta
de las láminas beta o en aminoácidos expuestos en la superficie, hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la
lámina beta de la proteína ubicuitina. Cada hebra beta consiste generalmente en 5-7 aminoácidos. Con referencia a
SEQ ID NO: 1, por ejemplo, las hebras beta de ubicuitina monómera por lo general abarcan los residuos de aminoá-
cidos 2-7, 12-16, 41-45 y 65-71. Regiones que se pueden modificar adicional y preferiblemente incluyen posiciones
de hasta 3 aminoácidos (es decir, 1, 2 o 3) adyacentes a la hebra de la lámina beta. Las regiones preferidas que se
pueden modificar adicional y preferiblemente incluyen, en particular, los residuos de aminoácidos 8-11, 62-64 y 72-
75. Las regiones preferidas incluyen giros beta que enlazan entre sí dos hebras beta. Un giro beta preferido incluye,
por ejemplo, los residuos de aminoácidos 62-64. Un aminoácido más preferido, que está muy cerca de la hebra beta
es el aminoácido en la posición 8. Además, otros ejemplos preferidos de sustituciones de aminoácidos son las posi-
ciones 36, 44, 70, 71 y/o 73. Por ejemplo, las regiones que se pueden modificar adicional y preferiblemente incluyen
los aminoácidos 62, 63 y 64 (3 aminoácidos), o 72, 73 (2 aminoácidos), u 8 (1 aminoácido).

El número de aminoácidos que se puede añadir o eliminar está limitado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o
más aminoácidos en una subunidad de ubicuitina monómera, y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18,
20, 22, 24, 26 o 28 aminoácidos con respecto a la proteína ubicuitina heterodímera, en general x veces el número de
modificaciones en la proteína monómera. Generalmente, el número de inserciones en una molécula monómera
comprende 1-10 aminoácidos y/o 1-7 deleciones de aminoácidos. El número de sustituciones es de al menos 6 y
como máximo 14 sustituciones de aminoácidos por molécula monómera. Una molécula dímera comprende en total,
al menos 12 y como máximo 28 sustituciones, y/o en total al menos una y como máximo 20 inserciones y/o al menos
una y como máximo 14 deleciones. Todos los números entremedio se pueden utilizar y se incluyen en la invención, y
son posibles todas las combinaciones de números de deleciones, inserciones y sustituciones, siempre que se man-
tenga la integridad estructural global de la molécula. En una realización de la invención, se mantiene la estructura de
lámina beta.

En realizaciones opcionales, los residuos de aminoácidos están alterados por sustituciones de aminoácidos. Sin
embargo, también son admisibles inserciones y deleciones. El número de aminoácidos que se puede añadir o elimi-
nar está limitado a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos en una subunidad de ubicuitina monómera, y en conse-

cuencia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 aminoácidos con respecto a la proteína ubiquitina dímera. En una realización, no se realizan inserciones de aminoácidos. En una realización adicional, no se han realizado deleciones.

5 Siempre que la proteína ubiquitina modificada de la presente invención, además de dichas sustituciones especificadas en las reivindicaciones y explicadas en este documento, también comprende deleciones y/o adiciones de uno o varios aminoácidos, las posiciones de aminoácidos dadas para ubiquitina humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) tienen que estar alineadas con la ubiquitina modificada con el fin de asignar las proteínas correspondientes entre sí. En caso de proteínas de fusión (véase a continuación), la numeración (y la alineación) de cada una de las subunidades de ubiquitina monómera se realiza de la misma manera, es decir, una alineación de, por ejemplo, un dímero se inicia en la posición aminoacídica 1 para cada subunidad respectiva.

10 En la proteína ubiquitina monómera, preferiblemente de mamíferos, por ejemplo, ser humano, al menos 10% de los aminoácidos presentes en las hebras beta o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de lámina beta, preferiblemente al menos 20%, aún más preferiblemente al menos 25%, se puede modificar, preferiblemente sustituir. Como máximo, con preferencia aproximadamente 50% de los aminoácidos presentes en las hebras beta o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de lámina beta, aún más preferiblemente como máximo aproximadamente 40% o aproximadamente 35% o hasta aproximadamente 30% o hasta aproximadamente 25% están modificados, preferiblemente sustituidos. En una hebra beta, en general, uno a cuatro aminoácidos se modifican. En una realización, dos de seis aminoácidos en una hebra beta, preferiblemente en la primera y en la cuarta hebra beta, por ejemplo, una región de residuos de aminoácidos 2-7 o 65-71, se modifican.

20 En una ubiquitina monómera modificada de acuerdo con la invención utilizada como unidad estructural para un heteromultímero se valora un total de hasta 20% de aminoácidos que se van a modificar. Teniendo en cuenta esto, hay una identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 de la proteína ubiquitina modificada de al menos 80%. En otras realizaciones de la invención, la identidad de secuencia a nivel de aminoácidos tiene al menos 83%, al menos 85%, al menos 87% y, además, al menos 90%, al menos 92% o al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La invención incluye también identidades de secuencia de aminoácidos de más del 97% de la proteína ubiquitina modificada en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 En una realización adicional de la invención, una ubiquitina ya modificada previamente (en donde 3 o 4 o 5 o 6 o 7 aminoácidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y/o 68 de SEQ ID NO: 1 se han modificado) se utiliza como punto de partida para otras modificaciones para generar una propiedad de unión a una diana, y se puede obtener una ubiquitina en la que en total hasta 9, 10, 11, 12, 13, 14 y como máximo 15 aminoácidos de la ubiquitina de SEQ ID NO: 1 se modifican, preferiblemente se sustituyen. Por ejemplo, otras modificaciones podrían comprender modificaciones en los aminoácidos 74 y 75 o en el aminoácido 45 para generar una mejor estabilidad o propiedades proteoquímicas. De acuerdo con un ejemplo, una ubiquitina monómera modificada como unidad estructural para una proteína heteromultímera se podría obtener de esta manera teniendo 14 sustituciones y una deleción. Basándose en el número total de aminoácidos de la ubiquitina esto se corresponde con un porcentaje de aproximadamente 20%. Esto era extraordinariamente sorprendente y no podía esperarse ya que normalmente un porcentaje mucho menor ya es suficiente para perturbar el plegamiento de la proteína.

40 En una realización de la invención, los aminoácidos se modifican para la generación de una región que tiene nuevas propiedades de unión que forma una región contigua en la superficie de la proteína. De esta manera, se puede generar una región contigua que tiene una propiedad de unión con el ligando diana. "Región contigua" de acuerdo con la invención se refiere a lo siguiente: debido a la carga, la estructura espacial y la hidrofobicidad/hidrofiliidad de sus cadenas laterales, los aminoácidos interaccionan con su entorno de forma correspondiente. El entorno puede ser el disolvente, generalmente agua, u otras moléculas, por ejemplo, aminoácidos próximos en el espacio. Por medio de información estructural acerca de la proteína, así como el programa informático correspondiente, la superficie de las proteínas se puede caracterizar. Por ejemplo, la región de interconexión entre los átomos de la proteína y el disolvente se puede visualizar de esta forma, incluyendo la información acerca de cómo está estructurada esta región de interconexión, qué áreas de la superficie son accesibles al disolvente o cómo se distribuyen las cargas en la superficie. Una región contigua se puede determinar, por ejemplo, mediante una visualización de este tipo usando un programa informático adecuado. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. De acuerdo con la invención, básicamente, también toda la región expuesta de la superficie se puede utilizar como la región contigua en la superficie que se va a modificar para la generación de nuevas propiedades de unión. En una realización, para este fin una modificación también puede comprender la región α -helicoidal. En una proteína ubiquitina modificada heterodímera, una región determinante de unión comprende dos de las regiones expuestas en la superficie que forman juntas una región contigua que comprende dos veces la longitud de una región determinante de unión.

55 La modificación de aminoácidos en al menos una región expuesta en la superficie de la proteína que comprende al menos una hebra beta de la región de la lámina beta o posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la lámina beta, es crucial. La "estructura de lámina beta" se define por ser esencialmente similar a una lámina y estar casi completamente estirada. Al contrario que con las hélices alfa que se forman a partir de un segmento continuo de la cadena polipeptídica, las láminas beta pueden estar formadas por diferentes regiones de la cadena polipeptídica. De esta manera, regiones más separadas en la estructura primaria pueden conseguir una gran proximidad entre sí. Una hebra beta típicamente tiene una longitud de 5-10 aminoácidos (normalmente 5-6 residuos en la ubiquitina) y

tiene una conformación casi completamente estirada. Las hebras beta se pueden acercar tanto entre sí que forman enlaces de hidrógeno entre el grupo C-O de una de hebra y el grupo NH de la otra hebra y viceversa. Las láminas beta se pueden formar a partir de varias hebras y tienen una estructura similar a una lámina en donde la posición de los átomos C alfa alternan entre por encima o por debajo del plano en forma de lámina. Las cadenas laterales de los aminoácidos siguen este patrón y, por lo tanto, apuntan alternativamente hacia la parte superior o hacia la parte inferior. Dependiendo de la orientación de las hebras beta, las láminas se clasifican en láminas paralelas y antiparalelas. De acuerdo con la invención ambas se pueden mutar y utilizar para la preparación de las proteínas reivindicadas.

Para la mutagénesis de la estructura de lámina beta, regiones de hebra beta o posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la lámina beta se seleccionan en la ubicuitina que está cerca de la superficie. Los aminoácidos expuestos en la superficie se pueden identificar con respecto a la estructura cristalográfica disponible con rayos X. Si no hay ninguna estructura cristalina disponible, se pueden realizar intentos por medio de análisis por ordenador para predecir las regiones de lámina beta expuestas en la superficie y la accesibilidad de posiciones de aminoácidos individuales con respecto a la estructura primaria disponible, o crear modelos de la estructura proteica en 3D y obtener información acerca de aminoácidos potenciales expuestos en la superficie de esta manera. Una explicación adicional de ello se puede encontrar, por ejemplo, en J. Mol. Biol., 5 de abril de 1987; 194 (3):531-44. Vijay-Kumar S, Bugg C.E., Cook W.J.

Sin embargo, también es posible llevar a cabo modificaciones en la lámina beta o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de lámina beta, en las que se puede omitir la preselección que, requiere mucho tiempo, de las posiciones de aminoácidos que se van a mutagenizar. Esas regiones de ADN que codifican las estructuras de lámina beta o de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la lámina beta se aíslan a partir de su entorno de ADN, se someten a mutagénesis aleatoria y se vuelven a integrar después en el ADN que codifica la proteína a partir del cual se habían retirado previamente. Esto viene seguido por un proceso de selección de mutantes con propiedades de unión deseadas.

En otra realización de la invención, las regiones de la hebra beta o de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la lámina beta cerca de la superficie, se seleccionan tal y como ya se ha explicado anteriormente, y se identifican las posiciones de aminoácidos que se van a mutar dentro de estas regiones seleccionadas. Las posiciones de aminoácidos seleccionadas de esta manera se pueden mutagenizar después a nivel de ADN, ya sea por mutagénesis dirigida al sitio, es decir, un codón que codifica un aminoácido específico se sustituye por un codón que codifica otro aminoácido específico seleccionado previamente, o esta sustitución se lleva en el contexto de una mutagénesis aleatoria en donde la posición del aminoácido que se va a sustituir se define pero no el codón que codifica el nuevo aminoácido todavía sin determinar.

Los aminoácidos expuestos en la superficie son aminoácidos que son accesibles al disolvente circundante. Si la accesibilidad de los aminoácidos en la proteína es superior al 8% en comparación con la accesibilidad del aminoácido en el modelo tripéptido Gly-X-Gly, los aminoácidos se denominan "expuestos en la superficie". Estas regiones proteicas o estas posiciones de aminoácidos individuales, respectivamente, también son sitios de unión preferidos para parejas de unión potenciales para las que se realiza una selección de acuerdo con la invención. Además, se hace referencia a Caster et al., 1983 Science, 221, 709-713, y Shrake & Rupley, 1973 J Mol Biol. 79 (2):351-371, los cuales se incorporan como referencia en esta solicitud para una descripción completa.

Las variaciones de ubicuitina que difieren en sustituciones de aminoácidos en la región del sitio de unión artificial generado de novo procedente de la proteína parental y de las demás, se pueden generar por una mutagénesis dirigida de los segmentos de secuencia respectivos. En este caso, los aminoácidos que tienen ciertas propiedades tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad o hidrofiliidad se pueden reemplazar o sustituir, respectivamente, por aminoácidos con otras propiedades respectivas. Además de las sustituciones, los términos "mutagénesis" y "modificado" y "sustituido" comprenden también inserciones y deleciones. A nivel proteico, las modificaciones también se pueden llevar a cabo mediante alteración química de las cadenas laterales de aminoácidos de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Métodos de mutagénesis de ubicuitina

Como punto de partida para la mutagénesis de los respectivos segmentos de la secuencia, se puede emplear, por ejemplo, el ADNc de ubicuitina que se puede preparar, alterar y amplificar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Para una alteración específica del sitio de la ubicuitina en regiones relativamente pequeñas de la secuencia primaria (aproximadamente 1-3 aminoácidos) están disponibles reactivos y métodos presentes en el mercado ("Quick Change", Stratagene; "Mutagene Phagemid in vitro Mutagenesis Kit", Biorad). Para la mutagénesis dirigida al sitio de regiones más grandes, realizaciones específicas, por ejemplo, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), están disponibles para los expertos en la técnica. Para este fin, se puede utilizar una mezcla de oligodeoxinucleótidos sintéticos que tienen composiciones de pares de bases degeneradas en las posiciones deseadas, por ejemplo, para la introducción de la mutación. Esto también se puede lograr mediante el uso de análogos de pares de bases que no se producen naturalmente en el ADN genómico, tales como por ejemplo, inosina.

El punto de partida para la mutagénesis de una o varias hebras beta de la región de la lámina beta o de posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de lámina beta, puede ser por ejemplo el ADNc de ubicuitina o tam-

bién el ADN genómico. Además, el gen que codifica la proteína ubiquitina se puede preparar también sintéticamente.

En una realización de la invención, la mutagénesis se lleva a cabo mediante el ensamblaje de oligonucleótidos de ADN que son portadores del codón de aminoácidos NNK. Se debe entender, sin embargo, que también se pueden utilizar otros codones (tripletes). Las mutaciones se llevan a cabo de una manera que se conserva preferiblemente la estructura de lámina beta. En general, la mutagénesis se lleva a cabo en el exterior de una región de lámina beta estable, expuesta en la superficie de la proteína. Comprende tanto mutagénesis específica del sitio como mutagénesis aleatoria. La mutagénesis específica del sitio que comprende una región relativamente pequeña en la estructura primaria (aproximadamente 3-5 aminoácidos) se puede generar con los kits comercialmente disponibles de Stratagene® (QuickChange®) o Bio-Rad® (kit de mutagénesis *in vitro* de fagémidos de Mutagene®) (véanse los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.789.166; nº 4.873.192).

Si regiones más extendidas están sometidas a mutagénesis específica del sitio, se tiene que preparar un casete de ADN en el que la región que se va a mutagenizar se obtiene mediante el ensamblaje de oligonucleótidos que contienen las posiciones mutadas y las posiciones sin modificar (Nord et al., 1997 Nat. Biotechnol. 8, 772-777; McConnell y Hoess, 1995 J. Mol. Biol. 250, 460-470). La mutagénesis aleatoria se puede introducir mediante la propagación del ADN en cepas mutadoras o mediante la amplificación por PCR (PCR propensa a error) (por ejemplo, Pannekoek et al., 1993 Gene 128, 135-140). Para este fin, se utiliza una polimerasa con una tasa de error incrementada. Para mejorar el grado de la mutagénesis introducida o para combinar diferentes mutaciones, respectivamente, las mutaciones en los fragmentos de PCR se pueden combinar por medio del barajado de ADN (Stemmer, 1994 Nature 370, 389-391). Una revisión de estas estrategias de mutagénesis con respecto a las enzimas se proporciona en la revisión de Kuchner y Arnold (1997) TIBTECH 15, 523-530. Para llevar a cabo esta mutagénesis aleatoria en una región de ADN seleccionada también se tiene que construir un casete de ADN que se usa para la mutagénesis.

Diferentes procedimientos conocidos per se disponibles para la mutagénesis, son métodos para la mutagénesis específica del sitio, métodos para la mutagénesis aleatoria, mutagénesis utilizando PCR o métodos similares.

En una realización preferida de la invención, se predeterminan las posiciones de aminoácidos que se van a mutagenizar. La selección de los aminoácidos que se van a modificar se lleva a cabo para satisfacer las limitaciones de la presente reivindicación 1 con respecto a aquellos aminoácidos que se van a modificar. En cada caso, se establece generalmente una genoteca de diferentes mutantes la cual se escruta usando métodos conocidos per se. Generalmente, una preselección de los aminoácidos que se van a modificar se puede realizar de forma particularmente fácil ya que está disponible suficiente información estructural de la proteína ubiquitina que se va a modificar.

Los métodos para la mutagénesis dirigida, así como la mutagénesis de segmentos de secuencia más largos, por ejemplo, por medio de PCR, mediante mutagénesis química o usando cepas mutadoras bacterianas, también pertenecen a la técnica anterior y se pueden utilizar de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, la mutagénesis se lleva a cabo mediante el ensamblaje de oligonucleótidos de ADN que son portadores del codón de aminoácido NNK. Se debe entender, sin embargo, que también se pueden utilizar otros codones (tripletes). Las mutaciones se llevan a cabo de manera que la estructura de lámina beta se conserva preferiblemente. En general, la mutagénesis se lleva a cabo en el exterior de una región de lámina beta estable expuesta en la superficie de la proteína. Comprende tanto la mutagénesis específica del sitio como la aleatoria. La mutagénesis específica del sitio que comprende una región relativamente pequeña en la estructura primaria (aproximadamente 3-5 aminoácidos) se puede generar con los kits disponibles comercialmente de Stratagene® (QuickChange®) o Bio-Rad® (kit de mutagénesis *in vitro* de fagémidos de Mutagene®) (véanse los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.789.166; nº 4.873.192).

Si regiones más extendidas están sometidas a mutagénesis específica del sitio, se tiene que preparar un casete de ADN en el que la región que se va a mutagenizar se obtiene mediante el ensamblaje de oligonucleótidos que contienen las posiciones mutadas y las posiciones sin modificar (Nord et al., 1997 Nat. Biotechnol. 8, 772-777; McConnell y Hoess, 1995 J. Mol. Biol. 250, 460-470). La mutagénesis aleatoria se puede introducir mediante la propagación del ADN en cepas mutadoras o mediante la amplificación por PCR (PCR propensa a error) (por ejemplo, Pannekoek et al., 1993 Gene 128, 135-140). Para este fin, se utiliza una polimerasa con una tasa de error incrementada. Para mejorar el grado de la mutagénesis introducida o para combinar diferentes mutaciones, respectivamente, las mutaciones en los fragmentos de PCR se pueden combinar por medio del barajado de ADN (Stemmer, 1994 Nature 370, 389-391). Una revisión de estas estrategias de mutagénesis con respecto a las enzimas se proporciona en la revisión de Kuchner y Arnold (1997) TIBTECH 15, 523-530. Para llevar a cabo esta mutagénesis aleatoria en una región de ADN seleccionada también se tiene que construir un casete de ADN que se usa para la mutagénesis.

La sustitución aleatoria de aminoácidos de acuerdo con un ejemplo de la presente invención de al menos 3, preferiblemente al menos 6 aminoácidos en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y/o 68 de ubiquitina monómera, se puede realizar de forma especialmente sencilla por medio de PCR ya que las posiciones mencionadas están localizadas cerca de los extremos amino o carboxi terminales de la proteína. Por consiguiente, los codones que se van a manipular están en el extremo 5' y 3' de la hebra de ADNc correspondiente. Por lo tanto, el primer oligodesoxinucleótido utilizado para una reacción de PCR mutagénica - además de los codones en las posiciones 2, 4, 6 y/o 8 que se van a mutar - se corresponde en secuencia a la hebra que codifica el extremo amino terminal de la ubiquitina. En

consecuencia, el segundo oligodesoxinucleótido - además de los codones en las posiciones 62, 63, 64, 65, 66 y/o 68 que se van a mutar - se corresponde al menos parcialmente a la hebra no codificante de la secuencia polipeptídica del extremo carboxi terminal. Por medio de ambos oligodesoxinucleótidos se puede realizar una reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de ADN que codifica la proteína ubiquitina monómera como molde.

- 5 Además, el producto obtenido de la amplificación se puede añadir a otra reacción en cadena de la polimerasa usando oligodesoxinucleótidos flanqueantes que introducen, por ejemplo, secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Se prefiere, de acuerdo con la invención, introducir el casete génico obtenido en un sistema de vector adecuado para uso en el procedimiento de selección posterior para el aislamiento de variaciones de ubiquitina que tienen propiedades de unión a un hapteno o un antígeno predeterminado.
- 10 La sustitución de aminoácidos para la generación del nuevo dominio de unión específico del ligando seleccionado, se puede realizar de acuerdo con la invención con cualquier aminoácido deseado, es decir, para la modificación con la que se genera la nueva propiedad de unión al ligando seleccionado, no es obligatorio tener cuidado de que los aminoácidos tengan una propiedad química particular o una cadena lateral, respectivamente, que sea similar a la de los aminoácidos sustituidos, de manera que se puede utilizar cualquier aminoácido deseado para este propósito.
- 15 La etapa de modificación de los aminoácidos seleccionados se realiza de acuerdo con la invención preferiblemente mediante mutagénesis a nivel genético por mutagénesis aleatoria, es decir, una sustitución aleatoria de los aminoácidos seleccionados. Preferiblemente, la modificación de la ubiquitina se lleva a cabo por medio de métodos de ingeniería genética para la alteración de un ADN que pertenece a la proteína respectiva. Preferiblemente, la expresión de la proteína ubiquitina se lleva a cabo a continuación en organismos procariontes o eucariotas.
- 20 De acuerdo con la invención, una proteína ubiquitina modificada se puede preparar adicionalmente de forma preferible, mediante síntesis química. En realizaciones preferidas, los residuos de aminoácidos se alteran mediante sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, también son aceptables inserciones y deleciones. Opcionalmente, el número de aminoácidos que se va a insertar o delecionar es de 1 a 10, 1 a 5, 2, 3 o 4 aminoácidos. En una realización, no se realizan inserciones de aminoácidos. En una realización adicional, no se han realizado deleciones.
- 25 Después de haber realizado las modificaciones anteriores, los inventores han encontrado las secuencias de ubiquitina con aminoácidos modificados descritas en los ejemplos que se unen a sus dianas con afinidad muy alta (valores de Kd de hasta 10^{-10} M).

Regiones que se van a modificar en la ubiquitina

- 30 Las regiones para la modificación se pueden seleccionar básicamente en cuanto a si pueden ser accesibles para la pareja de unión seleccionada y si la estructura global de la proteína mostrará presumiblemente tolerancia frente a una modificación.

Además de las modificaciones en las hebras beta expuestas en la superficie, también se pueden realizar modificaciones en otras regiones expuestas en la superficie de la proteína, preferiblemente en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra beta. Estas regiones modificadas están involucradas en la unión recién generada con alta afinidad a una diana.

35

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, al menos 3 o 4 o 6, opcionalmente al menos 8, 10, 12 y como máximo 15 aminoácidos de ubiquitina expuestos en la superficie, preferiblemente ubiquitina de mamífero o humana, se pueden modificar en la ubiquitina monómera en donde se prefiere una sustitución como modificación. Esto comprende la modificación de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos expuestos en la superficie de ubiquitina. Estos, al menos 3 y como máximo 15, aminoácidos modificados expuestos en la superficie forman entonces la región con afinidad de unión hacia la pareja de unión predeterminada. Esta región se define en esta memoria como "región de dominio de unión" ("BDR"). A este respecto, se prefiere particularmente que al menos 2, opcionalmente al menos 4, más opcionalmente al menos 6, 8, 10, 12 y como máximo 15 de los aminoácidos expuestos en la superficie se encuentren en una región de lámina beta, es decir, en una hebra de lámina beta o distribuidos en varias hebras beta o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a una hebra de lámina beta. Se prefiere además que al menos 3 de todos los aminoácidos modificados, preferiblemente aminoácidos sustituidos, sean directamente contiguos entre sí en la secuencia primaria.

40

45

En otra realización opcional de la presente invención, los aminoácidos en una o dos hebras, preferentemente dos de las cuatro hebras beta en la proteína o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a preferiblemente dos de las cuatro hebras beta, se modifican para generar una nueva propiedad de unión. También es opcional una modificación en tres o cuatro de las cuatro hebras beta o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a tres o cuatro de las hebras beta, para la generación de una unión a una diana o un ligando seleccionado.

50

Se prefiere particularmente que los aminoácidos en la hebra amino-terminal y carboxi-terminal o en posiciones de hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra amino-terminal y carboxi-terminal se modifiquen, preferiblemente se sustituyan, para generar un nuevo sitio de unión para el ligando o la diana. A este respecto, se prefiere particularmente que hasta 3 aminoácidos adyacentes a la hebra de la lámina beta carboxi-terminal se modifiquen, preferiblemente se sustituyan, y hasta 1 aminoácido adyacente a la hebra de la lámina beta amino-terminal se modifique, preferiblemente

55

te se sustituya.

De acuerdo con la invención, la ubiquitina se modifica en sus aminoácidos, preferiblemente por sustitución, en al menos tres aminoácidos de las siguientes posiciones de una ubiquitina de mamífero, preferiblemente ubiquitina humana: 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66, 68. Estos, al menos tres, aminoácidos de dicho grupo de aminoácidos forman una región expuesta a la superficie, contigua en la superficie de ubiquitina, que se han encontrado que eran particularmente adecuados para la generación de proteínas modificadas que tenían una afinidad de unión que no existía previamente con respecto a una pareja de unión específica, por ejemplo, ED-B, TNFalfa, NGF, IgG, MIA-2 o cualquier otra diana. Al menos tres de estos residuos de aminoácidos tienen que estar modificados. Opcionalmente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de dichos residuos de aminoácidos se modifican, preferiblemente se sustituyen, opcionalmente en combinación con residuos de aminoácidos adicionales.

Con el fin de determinar el grado de identidad de secuencia de un derivado de la ubiquitina, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, se puede utilizar, por ejemplo, el programa de similitud local SIM (Xiaoquin Huang y Webb Miller, "Advances in Applied Mathematics", vol. 12: 337-357, 1991), puesto a disposición y gratuito por los autores y su instituto para el análisis de una alineación múltiple Clustal, W. (Thompson et al., Nucleic Acids Res., 22(22): 4673-4680, 1994). Preferiblemente, el grado de identidad de secuencia del derivado de SEQ ID NO: 1 se determina en relación con la secuencia completa de SEQ ID NO: 1.

Los métodos para determinar las afinidades de unión son conocidos per se y se pueden seleccionar por ejemplo a partir de los siguientes métodos: ELISA, tecnología basada en la resonancia de plasmón de superficie (SPR), ofrecida, por ejemplo, por Biacore®, cromatografía de exclusión por tamaño, anisotropía de fluorescencia, espectroscopia de fluorescencia y calorimetría de valoración isotérmica (ITC).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una proteína de unión heteromultímera de la invención fusionada con un componente farmacéutica y/o diagnósticamente activo; se hace referencia, por ejemplo, al documento de patente de EE.UU. n° 7.838.629 cuyo contenido completo se incorpora como referencia.

Una proteína de fusión de la invención puede comprender componentes no polipeptídicos, por ejemplo, enlazadores no peptídicos, ligandos no peptídicos, por ejemplo, para radionucleidos terapéutica o diagnósticamente relevantes. También puede comprender pequeños compuestos basados en ácidos orgánicos o no aminoácidos, por ejemplo, azúcar, oligosacárido o polisacárido, ácido graso, etc. En una realización preferida de la invención, la molécula de unión basada en ubiquitina está ligada a un enlazador o un ligando peptídico, basado en aminoácido o a una proteína que tiene propiedades terapéutica o diagnósticamente relevantes.

Especificidades de la unión (constantes de disociación)

Las especificidades de la unión de las proteínas de fusión de acuerdo con la invención son tal y como se han definido anteriormente para la proteína que no es de fusión, dadas en kD. De acuerdo con la invención, el término "Kd" define la afinidad de unión específica que está de acuerdo con la invención, en el intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M. Un valor de 10^{-5} M e inferior se puede considerar como una afinidad de unión cuantificable. Dependiendo de la aplicación, un valor de 10^{-7} - 10^{-11} M se prefiere, por ejemplo, para aplicaciones cromatográficas o 10^{-9} - 10^{-12} M para aplicaciones, por ejemplo, de diagnóstico o terapéuticas. Otras afinidades de unión preferidas están en el intervalo de 10^{-7} - 10^{-10} M, preferiblemente de 10^{-11} M.

Multimerización de ubiquitina

De acuerdo con la invención al menos dos monómeros de ubiquitina modificados de forma diferente, ligados genéticamente por fusión de cabeza a cola, se unen al mismo epítipo de la molécula diana, por ejemplo, ED-B, TNFalfa, IgG, Mia-2, NGF o a cualquier otra molécula diana, y solo son eficaces si ambas regiones del dominio de unión actúan conjuntamente. O, dicho de otro modo, se unen al mismo epítipo a través de una sola región de unión contigua que está formada por la interacción conjunta de ambas regiones de unión de los dos módulos.

Los monómeros se pueden conectar directamente o por medio de enlazadores. Los enlazadores preferidos adecuados son los de SEQ ID NO: 32 o los que tienen al menos la secuencia GIG o los que tienen al menos la secuencia SGGGG o cualquier otro enlazador, por ejemplo, GIG, SGGGG, SGGGGIG, SGGGSSGGGGIG o SGGGGSSGGGG. Sin embargo, hay muchos enlazadores posibles que se pueden usar en su lugar.

Genotecas

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a una genoteca que contiene ADN que codifica proteínas de ubiquitina monómeras modificadas tal y como se han definido anteriormente, que es la base para proporcionar las proteínas de ubiquitina heteromultímeras, preferiblemente heterodímeras de la invención.

En un aspecto adicional más de la invención, se proporciona una genoteca de fusión que contiene ADN, obtenida mediante la fusión de dos genotecas tal y como se ha especificado anteriormente; cada genoteca codifica diferentes unidades proteicas de ubiquitina monómeras modificadas con el fin de obtener proteínas de fusión de ubiquitina

heterodímeras, cuyas unidades monómeras se enlazan entre sí en una disposición de cabeza a cola. Dicha genoteca que codifica las proteínas de fusión heterodímeras de ubiquitina muestra una actividad de unión monovalente con respecto a una diana dada. Dicha unión entre sí se lleva a cabo ya sea mediante el uso de cualquiera de los enlazadores conocidos por el experto en la materia o un enlazador descrito en la presente memoria. "Modificado de forma diferente" también incluye la alternativa de que esté presente una molécula sin modificar en la proteína heterodímera.

El Ejemplo 1 describe la producción de una genoteca compleja. Sin embargo, se debe tener cuidado con la calidad de dicha genoteca. La calidad de una genoteca en la tecnología de armazón depende, en primer lugar, de su complejidad (número de variantes individuales) así como de la funcionalidad (integridad estructural y proteoquímica de los candidatos resultantes). Ambas características, sin embargo, pueden ejercer influencias negativas entre sí: el aumento de la complejidad de una genoteca mediante el aumento del número de posiciones modificadas en el armazón, podría dar lugar a un deterioro de las características proteoquímicas de las variantes. Esto podría dar como resultado una disminución de la solubilidad, la agregación y/o bajos rendimientos. Una causa de ello es la mayor divergencia de los armazones naturales que tienen un empaquetamiento de las proteínas que es favorable energéticamente.

Por lo tanto, construir una genoteca de armazones de este tipo de forma adecuada es un acto de equilibrio entre las posiciones extremas de introducir por un lado tantas variaciones como sea posible en la secuencia original con el fin de mejorarla para una diana, y, por otro lado, conservar la secuencia primaria original tanto como sea posible a fin de evitar efectos proteoquímicos negativos.

20 **Modificaciones específicas en proteínas de ubiquitina heterodímeras**

El heterodímero de ubiquitina de acuerdo con la invención que se une a un ligando de $K_d = 10^{-7} - 10^{-12}$ M y que muestra una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando, se selecciona entre las dos alternativas:

(1) en la primera unidad monómera, sustituciones al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 63, 64, 65 y 66; y

en la segunda unidad monómera, sustituciones al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 62, 63, 64, 65 y 66; opcionalmente, además, 2, y

(2) en la primera unidad monómera, sustituciones al menos en las posiciones de aminoácidos 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 y 66; y

en la segunda unidad monómera, sustituciones al menos en las posiciones de aminoácidos 6, 8, 62, 63, 64, 65 y 66; de forma opcional adicionalmente 2.

En una realización, la proteína de fusión es un dímero fusionado genéticamente de dicha proteína ubiquitina que tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones 6, 8, 63-66 del primer monómero de ubiquitina y sustituciones en los residuos de aminoácidos en las posiciones 6, 8, 62-66, y opcionalmente en la posición 2 del segundo monómero de ubiquitina, preferiblemente

- en el primer monómero de ubiquitina, se prefieren las sustituciones

Lisina (K) por Triptófano (W) o Fenilalanina (F) en la posición 6,

Leucina (L) por Triptófano o Fenilalanina (W, F) en la posición 8,

Lisina (K) por Arginina (R) o Histidina (H) en la posición 63,

Ácido glutámico (E) por Lisina (K), Arginina (R) o Histidina (H) en la posición 64,

Serina (S) por Fenilalanina (F) o Triptófano (W) en la posición 65 y

Treonina (T) por Prolina (P) en la posición 66;

- en el segundo monómero de ubiquitina, las sustituciones

Lisina (K) por Treonina (T), Asparagina (N), Serina (S) o Glutamina (Q) en la posición 6,

Leucina (L) por Glutamina (Q) o Treonina (T) o Asparagina (N) o Serina (S) en la posición 8,

Glutamina (Q) por Triptófano (W) o Fenilalanina (F) en la posición 62,

Lisina (K) por Serina (S), Treonina (T), Asparagina (N) o Glutamina (Q) en la posición 63,

Ácido glutámico (E) por Asparagina (N), Serina (S), Treonina (T) o Glutamina (Q) en la posición 64,

Serina (S) por Fenilalanina (F) o Triptófano (W) en la posición 65, y

Treonina (T) por Ácido glutámico (E) o Ácido aspártico (D) en la posición 66, y

opcionalmente Glutamina (Q) por Arginina (R), Histidina (H) o Lisina (K) en la posición 2.

5 Estas sustituciones alternativas en cada monómero se pueden combinar entre sí, sin ninguna limitación, siempre que los heterodímeros modificados de ubiquitina resultantes muestren una afinidad de unión específica hacia dicho ligando de $K_d = 10^{-7} - 10^{-12}$ M y muestren una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando, y a condición de que la estabilidad estructural de la proteína ubiquitina no se destruya o se obstaculice.

Las sustituciones más preferidas son las siguientes:

(1) en la primera unidad monómera al menos K6W, L8W, K63R, E64K, S65F y T66P;

10 y en la segunda unidad monómera al menos K6T, L8Q, Q62W, K63S, E64N, S65W y T66E; de forma opcional adicionalmente Q2R, o

(2) en la primera unidad monómera al menos Q2T, F4W, K6H, Q62N, K63F, E64K, S65L y T66S;

15 y en la segunda unidad monómera, modificaciones al menos en las posiciones 6, 8, 62, 63, 64, 65 y 66, además opcionalmente en la segunda unidad monómera al menos K6X, L8X, Q62X, K63X, E64X, S65X y T66X; T66E; de forma opcional adicionalmente Q2X, en donde X puede ser cualquier aminoácido.

Se prefieren particularmente las siguientes sustituciones en el primer monómero de ubiquitina para generar proteínas de unión para ED-B:

2: Q→T, 4: F→W, 6: K→H, 62: Q→N, 63: K→F, 64: E→K, 65: S→L, 66: T→S.

20 Se puede utilizar, o bien ningún enlazador o cualquier enlazador para conectar los dos monómeros de cabeza a cola. Enlazadores preferidos son los de SEQ ID NO: 32 o la secuencia GIG o SGGGGIG o SGGGSGGGGIG.

25 En una realización preferida, un heterodímero de ubiquitina con dos regiones determinantes de la unión que actúan conjuntamente para unir el ligando ED-B, comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 o 34. Una proteína de fusión preferida de la invención que comprende TNF-alfa como componente farmacéuticamente activo, tiene la secuencia de SEQ ID NO: 35 o 36. En otra realización, un heterodímero de ubiquitina con dos regiones determinantes de la unión que actúan conjuntamente para unir el ligando ED-B, comprende la secuencia de aminoácidos de Fig. 11 que se corresponde a SEQ ID NO: XX.

Una proteína preferida adicional se proporciona mediante la siguiente secuencia en donde XXXX puede ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 47).

```

MTIWHTLLTGKTILEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIWAGKQEDGRTLSDYNINFKLSLH
LVLRLRGGSGGGSGGGGGIG
MQIFVXTXTGKTILEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIWAGKQEDGRTLSDYNINFKLSLH
LVLRLRGG

```

30 Ejemplos de proteínas con estas secuencias se muestran en la Figura 11. Como enlazador se utilizó SGGGSGGGGIG en esta memoria: es de entender que también otro tipo de enlazadores o ningún enlazador son alternativas viables.

Polinucleótidos, vectores de células hospedadoras de la invención

35 En un aspecto adicional de la invención, la presente invención incluye también polinucleótidos que codifican una proteína o una proteína de fusión tal y como se ha descrito anteriormente. Además, los vectores que comprenden dicho polinucleótido están incluidos en la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, están incluidas las células hospedadoras que comprenden una proteína o una proteína de fusión descrita en este documento y/o un polinucleótido que codifica dicha proteína recombinante o proteína de fusión de la invención o un vector que contiene dicho polinucleótido.

40 Usos de las moléculas de ubiquitina modificadas heteromultímeras

Las proteínas de ubiquitina modificadas de la invención capaces de unirse a un ligando con alta afinidad se utilizan, por ejemplo, en la preparación de medios de diagnóstico para uso *in vitro* o *in vivo*, así como medios terapéuticos. Las proteínas de acuerdo con la invención se pueden utilizar, por ejemplo, como moléculas efectoras directas (modulador, antagonista, agonista) o dominios de reconocimiento de antígeno.

5 En el campo de la terapia y profilaxis médica humana y veterinaria, medicamentos farmacéuticamente eficaces que contienen al menos una proteína ubiquitina heterodímera modificada de acuerdo con la invención, se pueden preparar por métodos conocidos per se. Dependiendo de la preparación galénica, estas composiciones se pueden administrar parenteralmente mediante inyección o infusión, por vía sistémica, rectal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica o mediante otros métodos de aplicación empleados convencionalmente. El tipo de preparación farmacéutica depende del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad de la enfermedad, el paciente a tratar y otros factores conocidos por los expertos en el campo de la medicina.

Dependiendo de la pareja de fusión seleccionada, la composición farmacéutica de la invención se adapta para ser dirigida al tratamiento de enfermedades en las que la diana es abundante.

10 Las composiciones se adaptan para contener una dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad de la dosis a administrar depende del organismo a tratar, el tipo de enfermedad, la edad y el peso del paciente y otros factores conocidos per se.

15 Las composiciones contienen un vehículo farmacéutica o diagnósticamente aceptable y, opcionalmente, pueden contener otros agentes auxiliares y excipientes conocidos per se. Estos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los mismos, agentes estabilizantes, agentes tensioactivos, sales, tampones, agentes colorantes, etc.

20 La composición farmacéutica puede estar en forma de una preparación líquida, una crema, una loción para aplicación tópica, un aerosol, en forma de polvos, gránulos, comprimidos, supositorios o cápsulas, en forma de una emulsión o una preparación liposómica. Las composiciones son preferiblemente estériles, no pirógenas e isotónicas y contienen los aditivos farmacéuticamente aceptables y convencionales conocidos per se. Además, se hace referencia a las normas de la Farmacopea de los EE.UU. o a "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mac Publishing Company (1990).

25 Una "composición farmacéutica" de acuerdo con la invención puede estar presente en forma de una composición, en la que los diferentes ingredientes activos y los diluyentes y/o vehículos están en mezcla por adición entre sí, o pueden estar en forma de una preparación combinada, en donde los ingredientes activos están presentes en forma parcial o totalmente distinta. Un ejemplo de una combinación o preparación combinada de este tipo es un kit por partes.

30 Una "composición" de acuerdo con la presente invención, comprende al menos dos compuestos farmacéuticamente activos. Estos compuestos se pueden administrar simultáneamente o por separado con un intervalo de tiempo desde un minuto a varios días. Los compuestos se pueden administrar a través de la misma vía o una diferente; por ejemplo, la administración oral de un compuesto activo y la administración parenteral de otro, es posible. Además, los compuestos activos se pueden formular en un medicamento, por ejemplo, en una solución para infusión o como un kit que comprende ambos compuestos formulados por separado. Además, es posible que ambos compuestos estén presentes en dos o más envases.

35 En una realización adicional, la composición farmacéutica está en forma de un kit por partes, proporcionando entidades separadas para la proteína ubiquitina recombinante/proteína de fusión de la invención y para uno o varios agentes quimioterapéuticos.

40 Las proteínas de ubiquitina modificadas de acuerdo con la invención se pueden preparar por cualquiera entre muchas técnicas convencionales y bien conocidas, tales como estrategias simples de síntesis orgánica, técnicas de síntesis basadas en fase sólida o mediante sintetizadores automatizados disponibles comercialmente. Por otro lado, también se pueden preparar mediante técnicas recombinantes convencionales aisladas o en combinación con técnicas de síntesis convencionales.

Opcionalmente, las modificaciones se pueden realizar por ingeniería genética a nivel de ADN y expresión de la proteína modificada en organismos procariontes o eucariotes o *in vitro*.

En una realización adicional, dicha etapa de modificación incluye una etapa de síntesis química.

45 En un aspecto de la invención, dicha población de proteínas modificadas de forma diferente se obtiene mediante la fusión genética de dos genotecas de ADN en donde cada una codifica proteínas de ubiquitina monómeras modificadas de forma diferente.

Breve descripción de las Figuras

50 La **Figura 1** muestra que la recombinación de un monómero frontal (primero) modificado de ubiquitina con una región determinante de la unión denominada BDR1, con un monómero de ubiquitina modificado de forma diferente posterior (segundo), con una región determinante de la unión denominada BDR2 para generar un heterodímero, da como resultado un aumento significativo de la afinidad hacia ED-B, así como un aumento de la especificidad de la unión. Las moléculas de ubiquitina modificadas se analizan a través de Biacore[®], anisotropía de fluorescencia, unión sobre células y secciones de tejido. Se muestran ELISAs dependientes de la concentración (ELISA-conc) de la unión de varias variantes heterodímeras de ubiquitina a ED-B humana.

La **Figura 1A** muestra una afinidad de la unión de $K_d = 9,4 \mu\text{M} = 9,45 \times 10^{-6} \text{ M}$ para el monómero 41B10 (en esta memoria: SPWF28-41B10th). Los círculos negros muestran la unión del primer monómero 41B10 al fragmento 67B89 que representa el dominio extra B de la fibronectina. El fragmento testigo 6789 no contiene ED-B y se muestra con círculos blancos.

- 5 La **Figura 1B** muestra la afinidad de la unión de una ubiquitina heterodímera. El heterodímero contiene como primer monómero 41B10 combinado con un segundo monómero diferente lo que da como resultado la variante 46H9 (en esta memoria: SPWF28-46H9th). La afinidad de la unión de 46H9 se incrementa mucho en comparación con el monómero que se muestra en la Fig. 1 A, debido a la unión monovalente de ambos monómeros con la diana ED-B ($K_d = 131 \text{ nM} = 1,3 \times 10^{-7} \text{ M}$; en esta memoria se muestra como 67B89, círculos negros). El fragmento testigo 6789 no contiene ED-B y se muestra con círculos blancos.

La **Figura 2** muestra la afinidad y la actividad de una ubiquitina modificada basada en una molécula heterodímera que se une a ED-B fusionada con una citocina.

- 15 La **Figura 2A** muestra la gran afinidad del heterodímero 24H12 que se une a ED-B basado en ubiquitina modificada ($K_d 50,7 \text{ nM} = 5 \times 10^{-8} \text{ M}$). Los círculos negros muestran la unión de 24H12 con EDB; como testigo negativo se utilizó la unión de 24H12 a BSA (seroalbúmina bovina) (círculos blancos).

La **Figura 2B** muestra el aumento de la afinidad del heterodímero 24H12 que se une a ED-B basado en ubiquitina modificada, fusionado con la citocina TNFalfa para dar lugar una multimerización del heterodímero 24H12 ($K_d = 5,6 \text{ nM} = 5,6 \times 10^{-9} \text{ M}$).

- 20 La **Figura 2C** muestra un análisis de candidatos a modo de ejemplo, procedentes de una selección de la genoteca de ubiquitina modificada heterodímera, por ejemplo, las variantes heterodímeras 9E12, 22D1, 24H12 y 41B10. Los valores de K_d con ELISA se incrementan para la diana ED-B en comparación con la fibronectina citosólica (c-FN) utilizada como testigo, lo que confirma una unión específica a la diana.

- 25 La **Figura 2D** muestra los resultados de un análisis de la molécula de ubiquitina 9E12 heterodímera modificada a través de ensayos de interacción sin marcador, utilizando Biacore[®]. Se analizaron diferentes concentraciones de las variantes de ubiquitina heterodímeras (véase la leyenda de la figura: 0-15 microM de 9E12) para la unión a ED-B inmovilizada sobre un chip (Biacore) para analizar la interacción entre la variante heterodímera 9E12 y ED-B. No se pudo determinar una K_d a partir del análisis de las curvas de asociación y disociación.

- 30 La **Figura 2E** muestra los resultados de un análisis de la molécula de ubiquitina heterodímera modificada 41B10 a través de ensayos de interacción sin marcador, utilizando Biacore[®]. Se analizaron diferentes concentraciones de las variantes de ubiquitina heterodímeras (véanse las leyendas de la figura: 0-15 microM de 41B10) para la unión a ED-B inmovilizada sobre un chip (Biacore) para analizar la interacción entre la variante heterodímera 41B10 y ED-B. El análisis de las curvas de asociación y disociación daba como resultado una K_d de 623 nM ($6,2 \times 10^{-7} \text{ M}$).

- 35 La **Figura 3** muestra la contribución de variantes basadas en ubiquitina modificadas de forma diferente, a la afinidad y la especificidad de la unión. Las diferentes variantes comparten módulos de secuencias comunes que están marcados con letras minúsculas. Las variantes se analizaron con respecto a su unión a ED-B. La Figura 3 muestra diferentes combinaciones de monómeros que dan como resultado heterodímeros de ubiquitina modificados. Las variantes heterodímeras 46-A5, 50-G11 y 46H4 tienen todas el mismo primer (frontal) monómero modificado con BDR1 (marcado con la letra "a" en la figura), pero tienen un segundo (posterior) monómero de ubiquitina modificado en diferentes posiciones con BDR2. Las variantes 52-D10 y 52-B3 tienen un primer (frontal) monómero modificado en comparación con 46-H9 con BDR1, pero el mismo segundo (posterior) monómero de ubiquitina con BDR2 (marcado con la letra "e").

Los heterodímeros de ubiquitina modificados tienen las siguientes secuencias:

46-H4: SEQ ID NO: 25, 45-H9: SEQ ID NO: 26, 46-A5: SEQ ID NO: 27, 50-G11: SEQ ID NO: 28, 52-B3: SEQ ID NO: 29, 52-D10: SEQ ID NO: 30

- 45 Las secuencias descritas anteriormente fueron modificadas en el curso de los experimentos mediante la adición de un marcador His con la secuencia LEHHHHHH (SEQ ID NO: 31).

- 50 Tal y como se puede ver en la Figura 3, 46-H4 tiene una excelente afinidad de unión a ED-B ($K_d = 189 \text{ nM}$); 46-A5 y 52-D10 no tienen actividad de unión mientras que otras proteínas de ubiquitina modificadas proporcionan una actividad de unión menor en comparación con 46-H4 de ED-B. Por lo tanto, se puede concluir que se requieren ambos monómeros en una variante heterodímera para tener una alta afinidad de unión con una diana; ambos monómeros muestran una unión monovalente con la diana.

El heterodímero modificado de ubiquitina con actividad elevada de unión a ED-B, denominado 46 H9 se identifica por las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región de ambos dominios de unión en los dos monómeros, en comparación con los monómeros de ubiquitina de tipo silvestre:

en el primer módulo (BDR1) (a) Q2G, F4V, K6R, Q62P, K63H, E64A, S65T, T66L

en el segundo módulo (BDR2) (e) K6H, L8M, Q62K, K63P, E64I, S65A, T66E

50G11

en el primer módulo (46H9)(a) Q2G, F4V, K6R, Q62P, K63H, E64P, S65T, T66L

5 en el segundo módulo (c) K6M L8R, Q62M, K63N, E64A, S65R, T66L

46H4

en el primer módulo (46H9)(a) Q2G, F4V, K6R, Q62P, K63H, E64P, S65T, T66L

en el segundo módulo (d) K6G, L8W, Q62T, K63Q, E64Q, S65T, T66R

52B3

10 en el primer módulo (g) Q2R, F4P, K6Y, Q62P, K63P, E64F, S65A, T66R

en el segundo módulo (46H9) K6H, L8M, Q62K, K63P, E64I, S65A, T66E

52D10 (sin enlazador a ED-B)

en el primer módulo Q2V, F4C, K6R, Q62T, K63A, E64P, S65G, T66D

en el segundo módulo (46H9) (e) K6H, L8M, Q62K, K63P, E64I, S65A, T66E

15 46A5 (sin enlazador a ED-B)

en el primer módulo (46H9)(a) Q2G, F4V, K6R, Q62P, K63H, E64P, S65T, T66L

en el segundo módulo (b) K6L, L8M, Q62L, K63A, E64F, S65A,

La **Figura 4** muestra una alineación de secuencia. Línea 1: Dos monómeros de la proteína ubiquitina de tipo silvestre (1ª línea) están unidos con un enlazador SGGGSSGGGGIG de 12 aminoácidos que comienza en la posición 77 y termina en la posición 88; el segundo monómero con BDR2 comienza en la posición 89 con una metionina. Esta proteína ubiquitina de tipo silvestre dímera se alinea con la variante de ubiquitina modificada heterodímera 46-H9 (2ª línea) con diferentes modificaciones en el primer y en el segundo monómero, dando como resultado dos BDRs. Ambas BDRs actúan juntas en la unión de la diana debido a una unión monovalente a la diana.

La **Figura 5** muestra una alineación de la secuencia de una variante de ubiquitina heterodímera modificada 1041-D11 (1ª línea) con "Ub2_TsX9" (ubiquitina modificada en la posición 45 a Triptófano en ambos monómeros, mostrando el enlazador GIG entre los dos monómeros (posición 77 a 79; el segundo monómero se inicia con una metionina en la posición 80), y un intercambio de Glicina a Alanina en los últimos aminoácidos C-terminales del 2º monómero. La tercera línea muestra "Ubi-Dimer wt", la ubiquitina de tipo silvestre como dímero, que muestra una alineación sin enlazador (por lo tanto, el segundo monómero comienza en la posición 77 con una Metionina). La 4ª línea muestra el "Ubi-Monomer wt", que es la ubiquitina humana de tipo silvestre.

La **Figura 6** muestra un ELISA dependiente de la concentración de la unión de la variante de ubiquitina heterodímera 1041-D11 con ED-B humana. La variante 1041-D11 muestra una afinidad de unión muy elevada hacia ED-B ($K_d = 6,9 \text{ nM} = 6,9 \times 10^{-9} \text{ M}$). Los puntos negros muestran la afinidad de unión de la variante de ubiquitina heterodímera 1041-D11 con un fragmento de fibronectina que contiene ED-B (denominado 67B89-t0) en comparación con la falta de unión de esta variante con el testigo negativo (denominado 6789-t0) (círculos blancos).

La **Figura 7** muestra ELISAs competitivos dependientes de la concentración de la unión de una variante heterodímera de ubiquitina 1041-D11 a un fragmento de fibronectina inmovilizado que contiene ED-B (67B89) en presencia de cantidades crecientes de diana libre. 1041-D11 se disocia de 67B89 inmovilizado con una CI_{50} de 140 nM de 67B89 soluble, indicando que la unión de 1041-D11 no es un artefacto de un deterioro estructural de ED-B debido a la inmovilización sobre una superficie hidrófoba empleada en la configuración del ELISA-conc.

La **Figura 8** muestra un resultado de un análisis de la molécula de ubiquitina heterodímera modificada 1041-D11 en ensayos de interacción sin marcador utilizando Biacore®. Se analizaron diferentes concentraciones de la variante de ubiquitina heterodímera (véanse las leyendas de la figura: 0-200 nM de 1041-D11) para estudiar la unión a un fragmento de fibronectina que contenía ED-B (denominado 67B89) inmovilizado sobre un chip SA (Biacore). El análisis de las curvas de asociación y disociación dio como resultado una K_d de 1 nM ($\times 10^{-9} \text{ M}$) y una tasa K_{off} de $7,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ que indica una vida media larga de un complejo de 1041-D11 y ED-B.

La **Figura 9** muestra la unión de la variante de ubiquitina heterodímera 1041-D11 a ED-B en un ELISA dependiente de la concentración, analizando simultáneamente la estabilidad sérica de la actividad de unión. Se muestran diferen-

tes condiciones, tales como preincubación durante 1 hora a 37°C de la variante en suero de ratón o de rata o en PBST como testigo. Los valores de K_d se sitúan todos entre 10 y 20 nM. Por lo tanto, se puede concluir que la unión del heterodímero 1041-D11 a ED-B no se ve influenciada significativamente por el suero sanguíneo.

5 La **Figura 10** muestra un análisis de la formación de un complejo de la variante de ubiquitina heterodímera 1041-D11 con fragmentos de fibronectina mediante SE-HPLC.

10 La **Fig. 10 A** muestra la formación de un complejo de 1041-D11 con ED-B. Tres series de HPLC se superponen: el pico azul con un tiempo de retención de 21,651 min se origina a partir de 1041-D11 puro; el pico negro con un tiempo de retención de 26,289 min representa el fragmento de fibronectina 67B89; una mezcla de 1041-D11 y 67B89 da como resultado el pico rojo con un tiempo de retención de 21,407 minutos después de SE-HPLC. El desplazamiento del pico 1041-D11 a un tiempo de retención menor, así como la desaparición del pico de 67B89, indica la formación de un complejo de 1041-D11 y ED-B soluble.

15 La **Fig. 10 B** muestra el solapamiento de tres series de SE-HPLC de 1041-D11 (azul, 21,944 min), fragmento de fibronectina 6789 sin ED-B (negro, 26,289 min) y una mezcla de 1041-D11 y 6789 (línea roja con picos en 21,929 min y 26,289 min). No se observa casi ningún desplazamiento del pico de 1041-D11. Este hecho, junto con la falta de desaparición del pico de 6789, indica que no hay una unión significativa del fragmento de fibronectina 6789 sin ED-B.

20 La **Figura 11** muestra las posiciones de consenso y las sustituciones de aminoácidos de variantes de unión a ED-B. Se muestran 16 secuencias heterodímeras representativas que se han encontrado que tienen sorprendentemente fuertes afinidades de unión a ED-B. Las posiciones de los aminoácidos de consenso están en la primera región monómera determinante de la unión 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65, 66, mientras que las sustituciones de los aminoácidos de consenso son Q2T, F4W, K6H, Q62N, K63F, E64K, S65L y T66S.

La **Figura 12** muestra una alineación de secuencias de seis proteínas que se unen a MIA2 heterodímeras basadas en ubiquitina. El segundo monómero de ubiquitina comienza con una metionina en la posición 89 (1111-B4; 1111-C9) o en la posición 80 (1111-E10, 1111-F6, 1111-H12, 1111-H2).

25 La **Figura 13** muestra la alineación de las regiones determinantes de la unión BDR1 y BDR2 así como de los enlazadores de las proteínas que se unen a MIA2 heterodímeras basadas en ubiquitina de la Fig. 12. También se muestran intercambios de aminoácidos adicionales en la secuencia de ubiquitina.

30 La **Figura 14** muestra un ELISA dependiente de la concentración de la variante de unión a 1111-E10 de la Fig. 12 con MIA-2 biotinilada (MIA2 biot.), $K_d = 2,6$ microM (círculos negros); seroalbúmina humana testigo (HSA) (círculos blancos).

Figura 15 A. Se hicieron modificaciones en los residuos de aminoácidos en una serie de moléculas de la primera y segunda unidad monómera de ubiquitina y se realizaron alineaciones de secuencias para evaluar los sitios de unión más potentes. La parte A muestra la información de la secuencia de la primera unidad monómera modificada de ubiquitina y la Parte B de la segunda unidad monómera modificada de ubiquitina.

35 **Figura 15 B.** Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 68 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

40 **Figura 15 C.** Se muestra un ELISA dependiente de la concentración de la unión de la variante de ubiquitina heterodímera SPWF-15_6-A12 a TNFalfa humano. La proteína de unión SPWF-15_6-A12 muestra una afinidad de unión muy elevada hacia TNFalfa ($K_d = 12$ nM = $1,2 \times 10^{-8}$ M). La figura muestra la unión de alta afinidad frente a TNFalfa humano (círculos negros); BSA testigo (círculos blancos).

45 **Figura 15 D.** Secuencia de la proteína de unión ubiquitina heterodímera SPWF-15_16-D4_Th con especificidad hacia TNFalfa. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

Figura 15 E. Se muestra un ELISA dependiente de la concentración de la unión de la variante de ubiquitina heterodímera SPWF-15_16-D4_Th a TNFalfa humano. La proteína de unión SPWF-15_6-A12 muestra una afinidad de unión muy alta hacia TNFalfa ($K_d = 1,7$ nM = $1,7 \times 10^{-9}$ M). La figura muestra la unión con TNFalfa humano (círculos negros); testigo: seroalbúmina bovina (BSA) (círculos blancos).

50 La **Figura 16** muestra la unión a NGF de heterodímeros modificados a base de ubiquitina.

Figura 16A. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPWF9-1B7-th con especificidad hacia NGF. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 y en la posición 51 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

Figura 16B. Un ELISA dependiente de la concentración determina la afinidad de unión elevada de K_d $0,9 \mu\text{M} = 9 \times 10^{-7} \text{ M}$ hacia NGF. La figura muestra la unión con NGF humano recombinante (rhNGF; círculos negros); BSA testigo (círculos blancos).

5 **Figura 16C.** Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPWF9-6A2-th con especificidad hacia NGF. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62, 64-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

Figura 16D. Un ELISA dependiente de la concentración determina la unión de afinidad elevada de K_d $180 \text{ nM} = 1,8 \times 10^{-7} \text{ M}$ hacia NGF. La figura muestra la unión con NGF humano recombinante (rhNGF; círculos negros); BSA testigo (círculos blancos).

10 **Figura 17.** Proteínas heterodímeras que se unen a IgG.

Figura 17A. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPVF4-16B2-ts con especificidad hacia IgG. Las modificaciones están en las posiciones 6, 62, 63, 65, 66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 62-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

15 **Figura 17B.** Un ELISA dependiente de la concentración determina la afinidad de la unión de K_d $3,8 \mu\text{M}$ hacia IgG. La figura muestra la unión con IgG (círculos negros); BSA-1, BSA-2 testigos y Enbrel (círculos rojos, verdes y azules sin curva ajustada). Enbrel es portador del resto F_c de IgG1 humana. Una unión débil con Enbrel indica una unión de SPVF4-16B2-ts con el resto F_{ab} de IgG.

20 **Figura 17C.** Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPVF4-9C6-ts con especificidad hacia IgG. Las modificaciones están en las posiciones 6, 8, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. Enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

Figura 17D. Un ELISA dependiente de la concentración determina la afinidad de la unión de K_d $4,1 \mu\text{M}$ hacia IgG. La Figura muestra la unión con IgG (círculos negros), BSA testigo (círculos blancos) y Etanercept (nombre comercial Enbrel) (círculos rojos, sin curva ajustada). Enbrel es portador del resto F_c de IgG1 humana. Una unión débil con Enbrel indica una unión de SPVF4-9C6-ts con el resto F_{ab} de IgG

25 Ejemplos

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para una ilustración adicional de la invención. La invención se demuestra particularmente con respecto a la modificación de ubiquitina como un ejemplo. La invención, sin embargo, no se limita a ello, y los siguientes Ejemplos muestran simplemente la viabilidad de la invención basándose en la descripción anterior. Para una descripción completa de la invención también se hace referencia a la bibliografía citada en la solicitud y en el anexo incorporándose todos en su totalidad como referencia en la solicitud.

30

Ejemplo 1. Identificación de proteínas que se unen a ED-B heterodímeras basadas en proteínas de ubiquitina modificadas

Construcción de una genoteca y clonación

35 A menos que se indique de otro modo, se utilizaron métodos genéticos recombinantes establecidos, por ejemplo, como se describen en Sambrook et al.

Una genoteca aleatoria de heterodímeros de ubiquitina humana de alta complejidad se preparó mediante mutagénesis concertada de un total de 15 posiciones de aminoácidos seleccionados. Los aminoácidos modificados, que se habían sustituido por tripletes de NNK, comprendían al menos 3 aminoácidos seleccionados entre las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66, 68 dentro del primer monómero de ubiquitina y al menos 3 aminoácidos ácidos seleccionados entre las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66, 68 dentro del segundo monómero de ubiquitina. Ambos monómeros de ubiquitina estaban ligados genéticamente (cabeza a cola) mediante un enlazador de Glicina/Serina con al menos la secuencia GIG o mediante un enlazador de Glicina/Serina con al menos la secuencia SGGGG, por ejemplo, GIG, SGGGG, SGGGGIG, SGGGGSGGGGIG (SEQ ID NO: 32) o SGGGGSGGGG, pero es posible cualquier otro enlazador.

45 *Selección mediante presentación en fagos TAT*

La genoteca de ubiquitina heterodímera se enriqueció frente a la diana utilizando, por ejemplo, la presentación en fagos TAT como sistema de selección. Otros métodos de selección conocidos en la técnica pueden ser utilizados. La diana se puede inmovilizar no específicamente sobre superficies de unión a proteínas o a través de residuos biotinilados que se acoplan covalentemente con la proteína. Se prefiere la inmovilización a través de biotina sobre perlas de estreptavidina o tiras de neutravidina. Los fagos que se unen a la diana se seleccionan ya sea en solución o sobre una diana inmovilizada, por ejemplo, la diana biotinilada e inmovilizada con fago se incubó, seguido por lavado de los fagos unidos a la matriz y por elución de los fagos unidos a la matriz. En cada ciclo después de la incubación de la diana, las perlas se separaron magnéticamente de la solución y se lavaron varias veces. En los ciclos de selección uno a tres, se lavaron complejos ternarios inmovilizados sobre perlas magnéticas recubiertas con la diana.

50

En el cuarto ciclo de selección, se llevó a cabo varias veces un lavado. En el primer ciclo de selección, la diana biotinilada se inmovilizó con tiras de neutravidina mientras que en los ciclos dos a cuatro se realizaron selecciones en solución seguidas por inmovilización de los complejos fago-diana sobre Dynabeads® recubiertas con estreptavidina (Invitrogen). Después de lavar en los dos primeros ciclos de selección, las perlas se separaron de nuevo magnéticamente de la solución y los fagos de moléculas de ubiquitina modificadas unidas a la diana, se liberaron mediante elución con una solución ácida. En los ciclos de selección tres y cuatro, la elución de los fagos se llevó a cabo por elución competitiva con un exceso de diana. Los fagos eluidos se reamplificaron. Para una especificidad directa de los ligantes, una proteína similar a la diana se puede incluir durante la selección.

Como alternativa a la presentación en fagos TAT: selección por presentación en ribosomas

La genoteca de ubiquitina se enriqueció frente a la diana utilizando, por ejemplo, la presentación en ribosomas como sistema de selección (Zahnd et al., 2007), (Ohashi et al., 2007). Se pueden utilizar otros métodos de selección conocidos en la técnica. La diana se biotiniló de acuerdo con métodos convencionales y se inmovilizó sobre Dynabeads® recubiertas con estreptavidina (Invitrogen). Complejos ternarios que contenían ribosomas, ARNm y polipéptido de ubiquitina nascente fueron ensamblados utilizando el kit de síntesis de proteínas in vitro PURExpress® (NEB). Se realizaron dos rondas principales de selección en donde se incubaron complejos ternarios seguidas de dos rondas similares de selección. En cada ciclo después de la incubación de la diana, las perlas se separaron magnéticamente de la solución y se lavaron con tampón de presentación en ribosomas con rigor creciente. En los ciclos de selección uno a tres, se lavaron los complejos ternarios inmovilizados sobre perlas magnéticas cargadas con la diana. En el cuarto ciclo de selección, se realizó varias veces un lavado. Después del lavado en los dos primeros ciclos de selección, las perlas se separaron de nuevo magnéticamente de la solución y el ARNm de las moléculas de ubiquitina modificadas que se unían a la diana fue liberado de los ribosomas mediante la adición de EDTA 50 mM. En los ciclos de selección tres y cuatro, se realizó la elución del ARNm mediante elución competitiva con un exceso de diana (Lipovsek y Pluckthun, 2004). Después de cada ciclo, se llevó a cabo la purificación del ARN y la síntesis de ADNc utilizando el kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Alemania), el kit exento de ADN de Turbo (Applied Biosystems, EE.UU.) y la transcriptasa inversa Transcriptor (Roche, Alemania).

Clonación de combinaciones enriquecidas

Después del cuarto ciclo de selección, el ADNc sintetizado se amplificó por PCR según el método conocido en la técnica, se cortó con nucleasas de restricción apropiadas y se ligó en el vector de expresión pET-20b(+) (Merck, Alemania) a través de extremos cohesivos compatibles.

Análisis de éxito en colonias individuales

Después de la transformación en células NovaBlue(DE3) (Merck, Alemania), se cultivaron colonias individuales resistentes a la ampicilina. La expresión de la ubiquitina modificada que se une a la diana se logró cultivando en placas de 96 pocillos profundos (Genetix, GB) utilizando un medio de autoinducción (Studier, 2005). Las células se recogieron y posteriormente se lisaron. Después de la centrifugación, el material sobrenadante resultante se escrutó mediante ELISA recubierto con diana y un fragmento Fab específico de ubiquitina conjugado con peroxidasa de rábano picante (POD). Como reactivo de detección se utilizó TMB-Plus (Biotrend, Alemania) y se manifestó color amarillo usando solución de H₂SO₄ 0,2 M y se midió en un lector de placas a 450 nm frente a 620 nm.

Se realizaron varios ciclos de selección con presentación frente a la diana. En los dos últimos ciclos de selección, las moléculas de unión se eluyeron con un exceso de diana libre.

Por ejemplo, se identificaron proteínas de unión de ubiquitina modificadas heterodímeras frente a la diana ED-B, tales como 46H9 (SEQ ID NO: 6), 9E12 (SEQ ID NO: 7), 22D1 (SEQ ID NO: 8), 1041-D11 de la Figura 5 (SEQ ID NO: 33), 1045-D10 (SEQ ID NO: 34). Por ejemplo, se identificaron proteínas de unión de ubiquitina modificadas heterodímeras frente a otra diana, por ejemplo, la proteína 1111-E10 que se une a la diana MIA-2, Fig. 12 (SEQ ID NO: 53), las proteínas que se unen a la diana TNFalfa, SPWF-15_6-A12 Fig. 15B (SEQ ID NO: 57) y SPWF-15_16-D4 Fig. 15D (SEQ ID NO: 90), las proteínas que se unen a la diana NGF, SPWF9-1B7-th Fig. 16A (SEQ ID NO: 91) y SPWF9-6A2-th Fig. 16C (SEQ ID NO: 92) y proteínas que se unen a la diana IgG, SPVF4-16B2-ts Fig. 17A (SEQ ID NO: 93) y SPVF4-9C6-ts Fig. 17C (SEQ ID NO: 94).

Una alineación de la secuencia de un monómero de ubiquitina de tipo silvestre (Ubi monomer wt), con el dímero de ubiquitina de tipo silvestre (Ubi dimer wt) y la proteína ubiquitina de tipo silvestre (Ub2-TsX9 en la Figura 5, con un intercambio en la posición 45 de cada monómero y con dos sustituciones en el extremo C-terminal) con la variante heterodímera de ubiquitina modificada 1041-D11, se muestra en la Figura 5. En Ub2-TsX las sustituciones en el extremo C-terminal (GG a AA) del monómero aumentan la estabilidad sérica porque las desubiquitininas escinden detrás de GG de ubiquitina, pero no detrás de AA. La estructura secundaria de la ubiquitina de tipo silvestre en comparación con la ubiquitina con estas sustituciones en el extremo C-terminal, es casi idéntica.

Las ubiquitininas modificadas con mayor actividad de unión a ED-B, conocidas como 1041-D11 (mostradas en la FIGURA X; SEQ ID NO: 36) o 1045-D10 se identifican por las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con la de tipo silvestre: en el primer módulo: K6W, L8W, K63R, E64K, S65F, T66P; en el segundo módulo: K6T, L8Q, Q62W, K63S, E64N, S65W, T66E; opcionalmente Q2R (en la variante 1041-D11, pero no en la variante 1045-

D10). Enlazadores preferidos adecuados para la proteína de fusión son enlazadores que tienen al menos la secuencia GIG o que tienen al menos la secuencia SGGGG o cualquier otro enlazador, por ejemplo GIG, SGGGG, SGGGGIG, SGGGSSGGGGIG o SGGGSSGGGG. Sin embargo, hay muchos enlazadores posibles que se pueden usar en su lugar. Otros aglutinantes de EDB con su secuencia de consenso en la primera región determinante de unión monómera, se muestran en la Figura 11.

Ubicuitinas modificadas con mayor actividad de unión a MIA-2 se muestran en las Figuras 12-14.

Ubicuitinas modificadas con mayor actividad de unión a NGF se muestran en la Figura 16.

Ubicuitinas modificadas con mayor actividad de unión a TNFalfa se muestran en la Figura 15.

Ubicuitinas modificadas con mayor actividad de unión a IgG se muestran en la Figura 17.

10 **Ejemplo 2: Análisis de la unión de variantes modificadas que se unen a ED-B basadas en ubicuitina frente a una diana humana**

Ejemplo 2A. Análisis de la unión de variantes modificadas de unión basadas en ubicuitina mediante ELISA dependiente de la concentración

15 La unión de variantes basadas en ubicuitina a una diana humana se sometió a ensayo mediante un ELISA dependiente de la concentración. Cantidades crecientes de proteína purificada aplicadas a placas NUNC-MediSorp recubiertas con diana humana, BSA o HSA y otros posibles testigos, tales como fibronectina celular (cFN) en caso de utilizar ED-B como diana. El recubrimiento con antígeno con 50 µl de solución de proteína (10 µg/ml) por pocillo se realizó a 4°C durante una noche. Después de lavar las placas con PBS, 0,1% de Tween 20, pH 7,4 (PBST), los pocillos se bloquearon usando solución de bloqueo (PBS pH 7,4; 3% de BSA; 0,5% de Tween 20) a TA durante 2 h. Los pocillos se lavaron de nuevo tres veces con PBST y luego tres veces con PBS. Los pocillos recubiertos se incubaron con diferentes concentraciones de proteína que se une a la diana, a TA durante 1 h. Después de lavar los pocillos con PBST, se aplicaron conjugados de POD con un fragmento Fab anti-Ubi (AbyD) con una dilución apropiada en PBST. La placa se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 50 µl de solución de sustrato TMB (KEM-EN-Tec) a cada pocillo y se incubaron durante 15 min. La reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 0,2 M. Las placas de ELISA se leyeron utilizando el lector de ELISA TECAN Sunrise. Las mediciones de la absorbancia fotométrica se realizaron a 25 450 nm, usando 620 nm como longitud de onda de referencia. La Figura 6 muestra una unión con afinidad muy elevada de la variante 1041-D11 a ED-B (K_d = 6,9 nM). Esto se confirma con respecto a las otras moléculas diana MIA-2, TNFalfa, NGF e IgG mediante los resultados presentados en las Figuras 14, 15, 16 y 17, respectivamente. Por lo tanto, solo unas pocas modificaciones (hasta 8 sustituciones en cada monómero) en la ubicuitina de tipo silvestre dan como resultado afinidades hacia dianas dadas en el intervalo micromolar reducido.

Ejemplo 2B. Análisis de la unión de variantes de unión modificadas basadas en ubicuitina mediante ELISA competitivo dependiente de la concentración

35 El análisis de la unión se describe en esta memoria para la diana ED-B, pero sin una experimentación adicional, se puede utilizar para cualquier otra diana. ELISAs competitivos dependientes de la concentración analizaron la unión de la variante de ubicuitina 1041-D11 a un fragmento de fibronectina que contenía ED-B (67B89) en presencia de cantidades crecientes de diana libre. Las condiciones del ELISA fueron tal como se han descrito para el Ejemplo 2A, excepto que la proteína 1041-D11 se preincubó con ED-B (67B89) (0 µM-10 µM) o también con testigo negativo 6789 (0 µM-10 µM) durante 1 h y posteriormente la mezcla fue suministrada a la diana 67B89 que se había colocado en una placa MediSorp; después de ésto, la variante fue detectada por el anticuerpo correspondiente (anti-ubicuitina-Fab-POD; dilución 1:6500).

40 La Figura 7 muestra que la variante 1041-D11 tiene una afinidad de unión a ED-B muy elevada (CI₅₀ = 140 nM). El resultado mostrado en la Figura 6 se confirma, y solo unas pocas modificaciones (hasta 8 sustituciones en cada monómero) en la ubicuitina de tipo silvestre dan como resultado una unión a ED-B con una afinidad muy superior.

Ejemplo 2C. Análisis de la unión de variantes modificadas que se unen a ED-B basadas en ubicuitina mediante ELISA dependiente de la concentración que analiza la seroestabilidad de la actividad de unión

45 El ELISA se lleva a cabo usando procedimientos bien conocidos en la técnica tal y como se han descrito anteriormente (Ejemplo 2A y 2B). ED-B (aquí denominado 67B89) recubre placas de microtitulación, la variante se une a ED-B y se detecta mediante un anticuerpo específico de ubicuitina (anti-Ubi-Fab-POD). La variante en este ensayo se trata de diferentes maneras: la variante se incubó en suero de ratón durante 1 hora a 37°C (véase en la Figura 9, los círculos en azul); la variante se incubó en suero de rata durante 1 hora a 37°C (en la Fig. 13X, círculos en rojo); o la variante se incubó en PBS durante 1 h a 37°C (en Fig. 9, círculos en negro). La Figura 13 muestra que todas las K_ds de la variante 1041-D11 están entre 10,3 nM (en PBS) y 20,74 nM (en suero de ratón).

Ejemplo 2D. Análisis de la unión de variantes modificadas que se unen a ED-B basadas en ubicuitina mediante ensayos Biacore

Se analizaron diferentes concentraciones de la variante (por ejemplo, 0-200 nM de la variante, preferiblemente 1041-D11) para estudiar la unión a un fragmento de fibronectina que contenía ED-B (denominado 67B89) inmovilizado sobre un chip de CM5 (Biacore) usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los datos obtenidos se procesaron a través del programa informático de evaluación BIA y un ajuste 1:1-Langmuir. La K_D de la variante de 1041-D11 era 1,0 nM, tal y como se muestra en la Figura 8. Las constantes cinéticas de la unión eran $k_{on} = 7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off} = 7,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. La K_D de la proteína de fusión 1041-D11-TNFalfa era 1,13 nM. Las constantes cinéticas de la unión eran $k_{on} = 4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{off} = 5,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Ejemplo 2E. Análisis de la formación de complejos de variantes modificadas que se unen a ED-B basadas en ubiquitina mediante SE-HPLC

Para el análisis de la formación de complejos, se emplearon columnas 5/150 GL de Tricorn Superdex 75 (GE-Healthcare) ($V = 3 \text{ ml}$) y se aplicó una cantidad de proteína de 50 μl . Otras condiciones: tampón: 1 x PBS, pH 7,3, caudal: 0,3 ml/min, ejecución: 45 min (inyección de la muestra: después de 15 min). Condición: proteína 1041-D11 0,72 nmol + ED-B 0,72 nmol (en el presente documento denominada 67B89) o fibronectina como testigo negativo (denominada 6789) se incubaron durante 1 h a TA; a continuación, se aplicaron a la columna para el análisis de la formación de complejos. En la Figura 14, solo se muestra la variante en negro, solo se muestra la diana ED-B en azul, la variante de unión forma un complejo con ED-B en rosa. La Figura 10A muestra fibronectina que contiene ED-B (67B89) con la variante; la Figura 10B es la variante con fibronectina exenta de ED-B (6789). La figura muestra que la variante 1041-D11 forma un complejo junto con ED-B (67B89), pero no forma ningún complejo con fibronectina (6789), lo que confirma la especificidad.

Ejemplo 3. Proteínas de unión heterodímeras a base de ubiquitina con una unión a TNF-alfa mejorada

Se seleccionaron las proteínas de unión heterodímeras basadas en ubiquitina específicas de TNF-alfa de acuerdo con el método de la presente invención, es decir, se estableció una genoteca de fagos que incluía una población de proteínas de unión modificadas heterodímeras de ubiquitina que se escrutó para estudiar su potencial de unión con TNF-alfa. Se realizaron las siguientes modificaciones:

En el primer monómero: en uno o varios aminoácidos en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, opcionalmente además en una o varias de las posiciones 68, 70, 72-74, posiciones opcionalmente adicionales.

En el segundo monómero: modificaciones en uno o varios aminoácidos en las posiciones 6, 8, 62-66.

Como enlazador se utilizó SGGGSGGGGIG en la mayoría de los casos, excepto para 1144-D11 (SEQ ID NO: 79) y 1144-E9 (SEQ ID NO: 80). No se utilizó enlazador para 1144-D11 y 1144-E9 entre el primer y el segundo monómero de ubiquitina. Las posiciones 75 y 76 son AA o GG. El enlazador se muestra en la parte A de la Figura 15. Las afinidades de la unión se muestran en la Figura 15B-E.

Ejemplo 4. Generación de proteínas de unión heterodímeras basadas en ubiquitina con unión mejorada a MIA2

MIA2 es un marcador de diagnóstico y terapéutico, entre otras cosas en el contexto de cirrosis, fibrosis y cáncer de hígado. Una información detallada sobre este marcador se puede encontrar en el documento US2004076965.

La proteína diana para las proteínas de unión de ubiquitina modificadas de la invención es la región central estable de 101 aminoácidos de MIA-2, denominada en esta memoria SPR30-3. SPR30-3 es la porción estructurada de MIA-2. Es homóloga a MIA (CD-RAP), OTOR, TANGO excluyendo el péptido señal. Su peso molecular es de 11569.198 Da.

La región central aminoacídica de MIA-2 es la siguiente (SEQ ID NO: 95):

```
MLESTKLLADLKKCGDLECEALINRVSAMRDYRGPDCRYLNFTKGEEISVYVKLGEREDL
WAGSKGKEFGYFPRDAVQIEEVFISEEIQMSTKESDFLCL
```

Proteínas de unión heterodímeras basadas en ubiquitina específicas de MIA2 se seleccionaron de acuerdo con el método de la presente invención, es decir, se estableció una genoteca de fagos que incluía una población de proteínas de unión heterodímeras de ubiquitina modificadas que se escrutaron para analizar su potencial de unión a MIA2. Los resultados son los siguientes:

La Figura 13 muestra la alineación de las proteínas que se unen a MIA2 heterodímeras basadas en ubiquitina.

La variante 1111-E10 muestra afinidad en el intervalo micromolar hacia una diana biotinilada y la formación de complejos con cromatografía de exclusión por tamaño. El aglutinante más potente se denomina 1111-E10 con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 en la primera unidad monómera de ubiquitina (BDR1) y diferentes sustituciones en las posiciones 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 en la segunda unidad monómera de ubiquitina (BDR2).

La primera unidad monómera de ubiquitina (BDR1) muestra las mismas sustituciones que en 1111-H2 y 1111-H12.

Las variantes 1111-H2 y 1111-H12 se pueden tomar, por lo tanto, como una combinación de BDR1 y BDR2 que difieren solo en un aminoácido sustituido.

5 Se han evaluado las siguientes moléculas de unión más potentes: 1111-C9, 1111-B4 y 1111-F6. Estos aglutinantes eran insolubles o no mostraron ninguna unión con SPR30-3 de MIA2 en ELISA y en SEC. Las variantes 1111-E10 y 1111-C9, respectivamente, y 1111-B4 se enriquecieron (la sustitución adicional T9A en 1111-B4 se produjo varias veces). 1111-F6 no se enriqueció, pero parecía ser un candidato interesante debido a su señal elevada en un Hit-ELISA; este aglutinante parece ser, sin embargo, insoluble.

10 La Figura 14 muestra un ELISA dependiente de la concentración con la variante de unión 1111-E10 para MIA-2 biotinilada (MIA2 biot.), $K_d = 2,6$ microMolar (círculos negros); HSA testigo (círculos blancos). Se ha mostrado que esta variante 1111-E10 es la mejor molécula de unión a MIA2.

La secuencia es la siguiente:

MQIFVETFTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIWAGKQLEDGRTLSDY
 NIGWHPPELHLVLRRLGGGIGMQIFVRTETGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPD
 QQRLLIWAGKQLEDGRTLSDYNILMGYVLHLVLRRLAA
 (SEQ ID NO: 53)

Los enlazadores utilizados se adjuntan en la lista de secuencias adjunta:

15 1111-B4_21231 sggggsggggig SEQ ID NO: 96
 1111-C9_21265 sggggsggggig SEQ ID NO: 96
 1111-E10_21315 gig
 1111-F6_21331 gig
 1111-H12_21391 eig
 1111-H2_21371 gig

20 PUBLICACIONES

1. Birchler, M., F. Viti, L. Zardi, B. Spiess y D. Neri. 1999. Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nat Biotechnol* 17:984-8.
2. Brenmoehl, J., M. Lang, M. Hausmann, S. N. Leeb, W. Falk, J. Scholmerich, M. Goke y G. Rogler. 2007. Evidence for a differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa. *Int J Colorectal Dis* 22:611-23.
3. Dubin, D., J. H. Peters, L. F. Brown, B. Logan, K. C. Kent, B. Berse, S. Berven, B. Cercek, B. G. Sharifi, R. E. Pratt et al. 1995. Balloon catheterization induced arterial expression of embryonic fibronectins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1958-67.
4. Goodsell, D. S. 2001. FUNDAMENTALS OF CANCER MEDICINE: The Molecular Perspective: Antibodies. *The Oncologist* 6:547-548.
5. Kaczmarek, J., P. Castellani, G. Nicolo, B. Spina, G. Allemanni y L. Zardi. 1994. Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 59:11-6.
6. Menrad, A. y H. D. Menssen. 2005. ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments. *Expert Opin Ther Targets* 9:491-500.
7. Pujuguet, P., A. Hammann, M. Moutet, J. L. Samuel, F. Martin y M. Martin. 1996. Expression of fibronectin ED-A+ and ED-B+ isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 148:579-92.
8. Trachsel, E., M. Kaspar, F. Bootz, M. Detmar y D. Neri. 2007. A human mAb specific to oncofetal fibronectin selectively targets chronic skin inflammation in vivo. *J Invest Dermatol* 127:881-6.
9. Van Vliet, A., H. J. Baelde, L. J. Vleming, E. de Heer y J. A. Bruijn. 2001. Distribution of fibronectin isoforms in human renal disease. *J Pathol* 193:256-62.
10. Lipovsek, D. y Pluckthun, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods* 290, 51-67.

11. Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B.W. y Ueda, T. (2007). Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 352, 270-276.
12. Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-234.
- 5 13. Zahnd, C., Amstutz, P. y Plückthun, A. (2007). Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat. Methods* 4, 269-279.
14. Paschke, M. y W. Hohne (2005). *Gene* 350(1): 79-88
15. Brüser 2007 *Appl Microbiol Biotechnol* 76(1): 35-45

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Scil Proteins GmbH
- <120> UN MÉTODO PARA IDENTIFICAR PROTEÍNAS DE UBIQUITINA HETEROMULTÍMERAS MODIFICADAS CON CAPACIDAD PARA UNIRSE A LIGANDOS
- <130> P27761-WO01
- <150> EP09179147.5
- 15 <151> 14-12-2009
- <150> EP10186980.8
- <151> 08-10-2010
- <150> EP10162264.5
- <151> 07-05-2010
- 20 <160> 96
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 76
- <212> PRT
- 25 <213> artificial
- <220>
- <223> Proteína ubiquitina
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gln | Ile | Phe | Val | Lys | Thr | Leu | Thr | Gly | Lys | Thr | Ile | Thr | Leu | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Glu | Pro | Ser | Asp | Thr | Ile | Glu | Asn | Val | Lys | Ala | Lys | Ile | Gln | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Glu | Gly | Ile | Pro | Pro | Asp | Gln | Gln | Arg | Leu | Ile | Trp | Ala | Gly | Lys |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Leu | Glu | Asp | Gly | Arg | Thr | Leu | Ser | Asp | Tyr | Asn | Ile | Gln | Lys | Glu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
-
- | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Thr | Leu | His | Leu | Val | Leu | Arg | Leu | Arg | Gly | Gly |
| 65 | | | | 70 | | | | | | 75 | |
- 30 <210> 2
- <211> 91
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- 35 <223> Dominio ED-B de fibronectina oncofetal
- <400> 2

ES 2 441 803 T3

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

Ser Ile Gly Leu Arg Trp Thr Pro Leu Asn Ser Ser Thr Ile Ile Gly
20 25 30

Tyr Arg Ile Thr Val Val Ala Ala Gly Glu Gly Ile Pro Ile Phe Glu
35 40 45

Asp Phe Val Asp Ser Ser Val Gly Tyr Tyr Thr Val Thr Gly Leu Glu
50 55 60

Pro Gly Ile Asp Tyr Asp Ile Ser Val Ile Thr Leu Ile Asn Gly Gly
65 70 75 80

Glu Ser Ala Pro Thr Thr Leu Thr Gln Gln Thr
85 90

5 <210> 3
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante de ubiquitina 1H4

10 <400> 3
Met Trp Ile Lys Val His Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Thr Leu Ser
50 55 60

Arg Ser Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

15 <210> 4
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Variante de ubiquitina 4B10

20 <400> 4
Met Leu Ile Leu Val Leu Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

ES 2 441 803 T3

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

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

Pro Ile Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante de ubiquitina 5E1

<400> 5

Met Val Ile Asn Val Phe Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Arg Ser Thr
50 55 60

Ser Lys Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

10 <210> 6

<211> 164

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> Dímero de ubiquitina 46H9

<400> 6

Met Gly Ile Val Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys

ES 2 441 803 T3

35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Pro
50 55 60

Thr Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val His Thr Met
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Lys Pro Ile Ala Glu Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 7

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubicuitina 9E12

<400> 7

Met Arg Ile Pro Val Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

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

Ala Arg Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

10

ES 2 441 803 T3

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Met Thr Arg
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Met Asn Ala Arg Leu Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 8

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubicuitina 22D1

<400> 8

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

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Gly Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Ser Val Gly
50 55 60

Ala Met Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Leu Thr Trp
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

10 Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Arg Arg Leu Pro Pro Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 9

<211> 65

<212> ADN

ES 2 441 803 T3

<213> artificial

<220>

<223> Cebador F1

<400> 9
ggagaccaca acggtttccc tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac 60

5 **atatg** 65

<210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Cebador WUBI(co)RD_xho

<400> 10
 aaaaaaaaaac tcgagaccgc cacgcagacg cagaaccag 39

15 <210> 11
 <211> 834
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Estructura artificial His6-SUMO-TNFa

20 <400> 11
atgggcagca gccatcatca tcatcatcac ggcagcggcc tgggtgccgcg cggcagcgc 60
agcatgtcgg actcagaagt caatcaagaa gctaagccag aggtcaagcc agaagtcaag 120
cctgagactc acatcaatth aaaggtgtcc gatggatctt cagagatctt cttcaagatc 180
aaaaagacca ctcccttaag aagcgtgatg gaagcgttcg ctaaaagaca gggttaaggaa 240
atggactcct taagattcct gtacgacggt attagaattc aagctgatca gaccctgaa 300
gatttgaca tggaggataa cgatattatt gaggctcaca gagaacagat tgggtggtgtg 360
cgtagcagca gccgtacccc gagcgataaa ccggtggcgc atgtggtggc gaatccgcag 420
gccaagggcc agctgcagtg gctgaaccgt cgtgcgaatg cgctgctggc caacggcgtg 480
gaactgctg ataatcagct ggttgtgccc agcgaaggcc tgtatctgat ttatagccag 540
gtgctgttta aaggccaggg ctgcccagc acccatgtgc tgctgacca taccattagc 600
cgtattgcgg tgagctatca gaccaaagtg aacctgctgt ctgcgattaa aagcccgtgc 660
cagcgtgaaa ccccgaagg cgcggaagcg aaacctggt atgaaccgat ttatctgggc 720
ggcgtgttc agctgaaaa aggcgatcgt ctgagcgcgg aaattaaccg tccggattat 780
ctggattttg cggaaagcgg ccaggtgat tttggcatta ttgcgctgta ataa 834

25 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-TNFa-fw

30 <400> 12
tttttggat ccgtgcgtag cagcagc 27

<210> 13
 <211> 28
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-TNFa-rev
 <400> 13
 5 cttgtctctc gaggcggccg cttattac 28
 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-WUBI-fw
 <400> 14
 gttccaaggt ctcatggtat gcagatcttc gtg 33
 <210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-Linker-rev
 20 <400> 15
 gtggtgggat ccaccgccac caccagaacc gccacgcaga cg 42
 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-1H4-fw
 <400> 16
 gttccaaggt ctcatggtat gtggatcaag gtg 33
 30 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-4B10-fw
 <400> 17
 gttccaaggt ctcatggtat gttgatcctg gtg 33
 <210> 18
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-5E1-fw
 <400> 18
 45 gttccaaggt ctcatggtat gttatcaat gtg 33
 <210> 19
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>

<223> Cebador Dimer-t0a-rev
 <400> 19
 gtgggtgggat ccaccgccac caccagaacc accacgtaaa cg 42
 <210> 20
 5 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador SUMO-EDB-WUBI-fw
 10 <400> 20
 gttccaaggt ctcattggtat gcagatcttc gtg 33
 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 9E12-t0a-fw
 <400> 21
 gttccaaggt ctcattggtat gcgatccct gtg 33
 20 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Cebador 24H12-t0a-fw
 <400> 22
 gttccaaggt ctcattggtat gggtatcaag gtg 33
 <210> 23
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador 15G7-t0a-fw
 <400> 23
 35 gttccaaggt ctcattggtat ggagatcggg gtg 33
 <210> 24
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> Cebador 22D1-t0a-fw
 <400> 24
 gttccaaggt ctcattggtat gcttatcttg gtg 33
 <210> 25
 45 <211> 164
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Variante 46-H4
 50 <400> 25

ES 2 441 803 T3

Met Gly Ile Val Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Pro
50 55 60

Thr Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Gly Thr Trp
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Thr Gln Ala Thr Arg Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- <210> 26
- 5 <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> Variante 45-H9
- 10 <400> 26

ES 2 441 803 T3

Met Arg Ile Pro Val Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

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

Ala Arg Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Leu Thr Met
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Ala Phe Ala Thr Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- <210> 27
- 5 <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
<223> Variante 46-A5

- 10 <400> 27

ES 2 441 803 T3

Met Gly Ile Val Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Pro
 50 55 60

Thr Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Leu Thr Met
 85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Ala Phe Ala Thr Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- <210> 28
- 5 <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial

- <220>
- <223> Variante 50-G11

- 10 <400> 28

ES 2 441 803 T3

Met Gly Ile Val Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Pro
50 55 60

Thr Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Met Thr Arg
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Met Asn Ala Arg Leu Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 29

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante 52-B3

<400> 29

ES 2 441 803 T3

Met Arg Ile Pro Val Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

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

Ala Arg Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val His Thr Met
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Lys Pro Ile Ala Glu Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 30

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Variante 52-D10

<400> 30

Met Val Ile Cys Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

10

ES 2 441 803 T3

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Thr Ala Pro
 50 55 60

Gly Asp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val His Thr Met
 85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Lys Pro Ile Ala Glu Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Marcador His

<400> 31

Leu Glu His His His His His His

1 5

10 <210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> Enlazador de glicina/serina

<400> 32

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly

1 5 10

<210> 33

<211> 155

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1041-D11_TsX9

<400> 33

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Trp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Arg Lys
50 55 60

Phe Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Arg Ile Phe Val Thr Thr Gln Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Trp Ser Asn Trp
130 135 140

Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

<210> 34

<211> 155

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubicuitina SPVF-28_1045-D10_TsX9

<400> 34

Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Trp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp

10

ES 2 441 803 T3

Arg Ile Phe Val Thr Thr Gln Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Trp Ser Asn Trp
130 135 140

Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala
165 170 175

His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn
180 185 190

Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn
195 200 205

Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val
210 215 220

Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His
225 230 235 240

Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu
245 250 255

Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu
260 265 270

Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu
275 280 285

Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu
290 295 300

Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
305 310 315

<210> 36
<211> 318
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> proteína de fusión SPVF-28_1041-D11_T0uX9
<400> 36

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Trp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Arg Lys
50 55 60

Phe Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Arg Ile Phe Val Thr Thr Gln Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Trp Ser Asn Trp
130 135 140

Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala Ser Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Gly Ser Leu Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala
165 170 175

His Val Val Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser
180 185 190

Gln Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn
195 200 205

Gln Leu Val Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val
210 215 220

Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr
225 230 235 240

Val Ser Arg Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser
245 250 255

Ala Val Lys Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu
260 265 270

Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu
275 280 285

Lys Gly Asp Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp
290 295 300

Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
305 310 315

ES 2 441 803 T3

<210> 37
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1048-E10_TsX9

<400> 37
 Met Gln Ile Phe Val Trp Thr His Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys
 35 40 45
 Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro Arg Arg
 50 55 60
 Ser Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
 65 70 75 80
 Gln Ile Phe Val Ser Thr Thr Thr Gly Glu Thr Ile Thr Leu Glu Val
 85 90 95
 Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
 100 105 110
 Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
 115 120 125
 Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Ala Asp Pro Arg
 130 135 140
 Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 145 150 155

<210> 38
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1041-E6_TsX9

<400> 38

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Trp Thr His Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro Arg Arg
50 55 60

Ser Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Ser Thr Thr Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Arg
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Ala Asp Pro Arg
130 135 140

Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

<210> 39

<211> 155

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubicuitina SPVF-28_1041-H10_TsX9

<400> 39

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Asn Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Glu His Gly
50 55 60

Lys Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Asn Thr Thr Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Phe Ile Gly His
130 135 140

Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

<210> 40

<211> 158

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubicuitina SPVF-28_1056-B6_TsX6

<400> 40

Met Gln Ile Phe Val His Thr His Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Asn Arg Asp
50 55 60

10

ES 2 441 803 T3

Lys Arg Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Asn Thr Asn Thr Gly Glu Thr Ile
85 90 95

Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys
100 105 110

Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp
115 120 125

Ala Gly Lys Arg Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile
130 135 140

Asp Trp Arg Trp Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

<210> 41
<211> 154
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1051-B7_TsX9

<400> 41
Met Gln Ile Phe Val His Thr Thr Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Thr Leu Thr
50 55 60

Pro Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Leu Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Asp Trp Arg Trp
130 135 140

Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150

<210> 42
<211> 155
<212> PRT
<213> artificial

10

15

ES 2 441 803 T3

<220>

<223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1035-E6_TsX9

<400> 42

```

Met Gln Ile Phe Val His Thr Phe Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1          5          10          15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
          20          25          30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile His Glu Arg
          50          55          60

Glu Ile Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65          70          75          80

Gln Ile Phe Val Ser Thr Pro Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
          85          90          95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
          100          105          110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
          115          120          125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Val Glu Met
          130          135          140

Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145          150          155

```

- 5 <210> 43
- <211> 154
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>

10 <223> Dímero de ubiquitina SPVF-28_1049-D4_TsX9

<400> 43

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val His Thr Asp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Glu Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile His Asn Trp
50 55 60

Arg Asn Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Ile Thr Ile Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Lys Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Asp Trp Arg Trp
130 135 140

Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150

- <210> 44
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial

5

- <220>
- <223> Dímero de ubicuitina SPWF-28_1071-C8_TsX2

<400> 44
Met Trp Ile Arg Val Pro Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

10

ES 2 441 803 T3

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile His Met Pro
50 55 60

Asp Ile Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Met
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile His Leu His Met Arg Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 45

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubiquitina SPWF-28_1071-C12_TsX2

<400> 45

Met Thr Ile Trp Val His Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Asn Phe Lys
50 55 60

Leu Ser Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Ser Thr Phe

10

ES 2 441 803 T3

85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile His Tyr Leu Pro Lys Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 46

<211> 172

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Dímero de ubiquitina SPWF-28_1071-H7_TsX2

<400> 46

Met Trp Ile Arg Val Pro Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Arg Arg Val
50 55 60

Asn Tyr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Ser
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

10 Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Tyr Thr Tyr Met Arg Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly Leu Glu His His His His His His
165 170

<210> 47

<211> 164

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>
 <223> Dímero de ubiquitina con enlazador SGGGGSGGGGIG

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (94)..(94)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (96)..(96)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (150)..(154)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido presente en la naturaleza

15 <400> 47
 Met Thr Ile Trp Val His Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Asn Phe Lys
 50 55 60

 Leu Ser Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Xaa Thr Xaa
 85 90 95

 Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110

 Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125

 Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140

 Ser Asp Tyr Asn Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

20 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Enlazador de glicina/serina

25 <400> 48
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 49

<211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Enlazador de glicina/serina

 <400> 49
 Ser Gly Gly Gly Ile Gly
 1 5

 <210> 50
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Enlazador de glicina/serina

 <400> 50
 Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 15 1 5 10

 <210> 51
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> 1111-B4_21231

 <400> 51
 Met Gln Ile Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Lys Arg Asn
 50 55 60

 Pro Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Arg Thr Met
 85 90 95

 Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110

 Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125

 Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140

 Ser Asp Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Val Val Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

 Leu Arg Ala Ala

ES 2 441 803 T3

<210> 52
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> 1111-C9

<400> 52
 Met Gln Ile Phe Val Gly Thr Val Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys
 35 40 45
 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Lys Arg Asn
 50 55 60
 Pro Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Arg Thr Met
 85 90 95
 Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110
 Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125
 Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140
 Ser Asp Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Val Val Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

10 Leu Arg Ala Ala

<210> 53
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> 1111-E10

<400> 53

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Glu Thr Phe Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Trp His
 50 55 60

Pro Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
 65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Arg Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
 85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
 100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
 115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Met Gly Tyr
 130 135 140

Val Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 145 150 155

- 5 <210> 54
- <211> 155
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> 1111-F6
- 10 <400> 54

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Pro Thr Trp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Pro Arg
50 55 60

Thr Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Tyr Thr Thr Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Leu Val Ala
130 135 140

Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

- <210> 55
- 5 <211> 155
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> 1111-H12
- 10 <400> 55

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Glu Thr Phe Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Trp His
 50 55 60

Pro Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Glu Ile Gly Met
 65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Arg Thr Met Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
 85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
 100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
 115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Val
 130 135 140

Val Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 145 150 155

<210> 56

<211> 155

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1111-H2

<400> 56

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Glu Thr Phe Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Trp His
50 55 60

Pro Glu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ile Gly Met
65 70 75 80

Gln Ile Phe Val Arg Thr Met Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val
85 90 95

Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys
100 105 110

Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln
115 120 125

Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Val
130 135 140

Val Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
145 150 155

<210> 57
<211> 88
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>
<223> 6-A12

<400> 57
Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

10 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 58
<211> 88
<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> 16-A4

<400> 58

Met Tyr Ile Val Val Leu Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Ile Pro Gln
50 55 60

Met Ala Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

5

<210> 59

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> 7-D1

<400> 59

Met Met Ile Tyr Val Leu Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Glu Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro Thr Asp
50 55 60

Ala Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

15

<210> 60

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> 14-D11

<400> 60

ES 2 441 803 T3

Met Leu Ile Ile Val Gly Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro Thr Val
50 55 60

Asn Ala Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 61
<211> 88
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> 12-E6

<400> 61

Met Leu Ile Gly Val Arg Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Arg Gly
50 55 60

Thr Ala Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 62
<211> 88
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> 12-G9

<400> 62

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Trp Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Arg Ser Thr
50 55 60

Thr Met Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 63

<211> 76

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1144-D1

<400> 63

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

10

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Glu Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln His Leu Thr Phe Ala Gly Lys
35 40 45

Gln Leu Gly Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Leu Gly Val Trp Ala Ala
65 70 75

<210> 64

<211> 88

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> 1144-E9

<400> 64

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Lys Leu Lys His Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 65

<211> 118

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1076-H4

<400> 65

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

10

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Gln Leu Lys His Asp Ala Ala Asn Glu Ser Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Asn Glu Gly Gly Ala Ala
85 90 95

Trp Arg Asp Glu His Ile Glu Arg Asx Glu Trp Ser Ser Thr Glu Ile
100 105 110

Asn Gly Glu Asx Ala Thr
115

<210> 66

<211> 88

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> 1081-B11

<400> 66

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Tyr Leu Lys Ser Asp Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 67

<211> 88

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1081-H11

<400> 67

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asp Asp Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

10 <210> 68

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 1082-A10

<400> 68

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asp Asp Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 69

<211> 88

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1082-A11

<400> 69

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Lys Leu Gln Ser Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

10 <210> 70

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 1088-A5

<400> 70

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Lys Leu Lys Leu Ala Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

<210> 71

<211> 88

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1091-A2

<400> 71

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu His Leu His Leu His Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

10 <210> 72

<211> 88

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 1094-D9

<400> 72

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Lys Leu Leu His Ser Ala Ala Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
85

5 <210> 73
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 6-A12

10 <400> 73
Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

15 <210> 74
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 16-A4

<400> 74

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Arg Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

<210> 75

<211> 76

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 7-D1

<400> 75

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Ser Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr His
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

10 <210> 76

<211> 76

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 14-D11

<400> 76

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Ala Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Arg Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

ES 2 441 803 T3

<210> 77
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

5 <220>
<223> 12-E6

<400> 77
Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Ala Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

10 <210> 78
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 12-G9

15 <400> 78
Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Arg Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

20 <210> 79
<211> 76
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> 1144-D1

<400> 79

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Glu Thr Asp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Glu Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Thr Asp
50 55 60

Ala Ala Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

<210> 80

<211> 76

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1144-E9

<400> 80

Met Gln Ile Phe Val Glu Thr Ile Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Glu Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Tyr Asp Gln
50 55 60

Leu Ser Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

10 <210> 81

<211> 76

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> 1076-H4

<400> 81

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

ES 2 441 803 T3

<210> 82
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> 1081-B11

<400> 82
 Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys
 35 40 45
 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
 50 55 60
 Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 65 70 75

10 <210> 83
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 1081-H11

15 <400> 83
 Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15
 Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30
 Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys
 35 40 45
 Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
 50 55 60
 Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 65 70 75

20 <210> 84
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 1082-A10

25 <400> 84

ES 2 441 803 T3

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

<210> 85

<211> 76

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> 1082-A11

<400> 85

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
50 55 60

10

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

<210> 86

<211> 76

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> 1088-A5

<400> 86

Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
65 70 75

20 <210> 87

ES 2 441 803 T3

<211> 76
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 5 <223> 1091-A2

<400> 87
 Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
 50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 65 70 75

<210> 88
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> 1094-D4

<400> 88
 Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr
 50 55 60

Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Ala Ala
 65 70 75

15 <210> 89
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> SPWF-15_6-A12

<400> 89

ES 2 441 803 T3

Met Phe Ile Tyr Val Val Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Tyr
50 55 60

Pro Arg Leu Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Thr Thr Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- 5 <210> 90
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> SPWF-15_16-D4_Th
- 10 <400> 90

ES 2 441 803 T3

Met Tyr Ile Val Val Leu Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
 20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Ile Pro Gln
 50 55 60

Met Ala Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Val Thr Glu
 85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
 100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
 115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
 130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Arg Thr Gly Pro Leu His Leu Val Leu Arg
 145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- <210> 91
- 5 <211> 164
- <212> PRT
- <213> artificial

<220>
 <223> SPWF-9_1-B7_th

- 10 <400> 91

ES 2 441 803 T3

Met Met Ile Ser Val Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Asp Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Arg Ser Arg
50 55 60

Gly Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Leu Thr His
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Ser His Ser Arg Thr Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 92

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> SPWF-9_6-A2_th

<400> 92

ES 2 441 803 T3

Met Ala Ile Val Val Tyr Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Pro Met Pro
50 55 60

Val Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Asn Thr Ser
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Asp Gln Gln Arg Ile Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 93

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> SPVF-4_16-B2_ts

<400> 93

Met Gln Ile Phe Val Asp Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

10

ES 2 441 803 T3

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Leu Ile Glu
50 55 60

Trp Leu Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Asp Thr Leu
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Gly Ala Asp Ala Pro Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

<210> 94

<211> 164

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> SPVF-4_9-C6_ts

<400> 94

Met Gln Ile Phe Val Asp Thr Asp Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

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

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Thr Phe Asn
50 55 60

10

ES 2 441 803 T3

Pro Gln Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Ser Gly Gly Gly Ile Gly Met Gln Ile Phe Val Trp Thr Thr
85 90 95

Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu
100 105 110

Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln
115 120 125

Gln Arg Leu Ile Trp Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu
130 135 140

Ser Asp Tyr Asn Ile Pro His Trp Arg Ile Leu His Leu Val Leu Arg
145 150 155 160

Leu Arg Gly Gly

- <210> 95
- <211> 101
- <212> PRT
- <213> artificial

5

- <220>
- <223> Región central aminoacídica de MIA-2

<400> 95
Met Leu Glu Ser Thr Lys Leu Leu Ala Asp Leu Lys Lys Cys Gly Asp
1 5 10 15

Leu Glu Cys Glu Ala Leu Ile Asn Arg Val Ser Ala Met Arg Asp Tyr
20 25 30

Arg Gly Pro Asp Cys Arg Tyr Leu Asn Phe Thr Lys Gly Glu Glu Ile
35 40 45

Ser Val Tyr Val Lys Leu Ala Gly Glu Arg Glu Asp Leu Trp Ala Gly
50 55 60

Ser Lys Gly Lys Glu Phe Gly Tyr Phe Pro Arg Asp Ala Val Gln Ile
65 70 75 80

Glu Glu Val Phe Ile Ser Glu Glu Ile Gln Met Ser Thr Lys Glu Ser
85 90 95

Asp Phe Leu Cys Leu
100

- 10 <210> 96
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> artificial

- <220>
- 15 <223> Enlazador de glicina/serina

<400> 96
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ile Gly
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una ubiquitina modificada heteromultímera con capacidad de unión a un ligando, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) proporcionar una población de ubiquitina modificada heteromultímera procedente de proteínas de ubiquitina modificadas monómeras, comprendiendo dicha población proteínas heteromultímeras que comprenden dos o más monómeros de ubiquitina unidos entre sí en una disposición de cabeza a cola en la que al menos uno de dichos monómeros de dicha proteína heteromultímera se modifica de forma diferente al menos mediante sustituciones de los aminoácidos expuestos en la superficie, en al menos tres aminoácidos situados en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y 68 de SEQ ID NO: 1, teniendo dicha proteína monómera modificada una identidad de secuencia aminoacídica de al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% con la proteína ubiquitina sin modificar;
- 10 b) proporcionar un ligando potencial a dicha población de proteínas modificadas de forma diferente;
- c) poner en contacto dicha población de proteínas modificadas de forma diferente con dicho ligando;
- 15 d) identificar una proteína heteromultímera modificada por un proceso de escrutinio, en donde dicha proteína heteromultímera modificada se une a dicho ligando con una afinidad de unión específica de Kd en un intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M y muestra una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando; y opcionalmente
- e) aislar dicha ubiquitina modificada heteromultímera con dicha afinidad de unión.
2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha proteína heteromultímera es una proteína heterodímera o heterotrímera.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha proteína monómera modificada comprende una o varias inserciones de un total de 1 a 10 aminoácidos y/o una o varias deleciones de un total de 1 a 7 aminoácidos, además opcionalmente, en donde dicha proteína ubiquitina monómera modificada comprende al menos 6 y como máximo 14 sustituciones de aminoácidos, y en donde dicha proteína ubiquitina heterodímera modificada comprende en total al menos 12 y como máximo 28 sustituciones, y/o comprende en total al menos 1 y como máximo 20 inserciones y/o al menos 1 y como máximo 14 deleciones.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha proteína ubiquitina monómera modificada se puede obtener mediante ingeniería genética del ADN que codifica la ubiquitina y la expresión de dicha proteína en organismos procariontes o eucariotes o *in vitro*.
- 30 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha proteína multímera se proporciona mediante un método de selección *in vitro* que es preferentemente un método de presentación, opcionalmente un método de presentación en fagos, presentación ribosómica, presentación en fagos TAT, presentación en levaduras, presentación bacteriana, presentación en la superficie celular o presentación en ARNm.
- 35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho ligando es un antígeno o un hapteno.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde además 1 a 7 aminoácidos adicionales están sustituidos en al menos una de las proteínas de ubiquitina monómeras, los cuales se seleccionan opcionalmente entre uno o varios de los aminoácidos en las posiciones 36, 44, 70, 71 y, opcionalmente, además, 62, 63 y 64 o 72 y 73 u 8 de SEQ ID NO: 1.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha población de proteínas de fusión heteromultímeras de ubiquitina se proporciona mediante la fusión genética de dos genotecas de ADN codificando cada una proteínas monómeras modificadas de forma diferente, traduciendo el ADN en proteínas de fusión heterodímeras, presentando dichas proteínas y escrutando las proteínas presentadas en presencia de proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas que comprenden proteínas de ubiquitina monómeras que están enlazadas entre sí en una disposición de cabeza a cola en donde dichas proteínas de ubiquitina heteromultímeras modificadas se unen a dicho ligando con una afinidad de unión específica de Kd en un intervalo de 10^{-7} - 10^{-12} M y muestran una actividad de unión monovalente con respecto a dicho ligando o en donde dicha población de proteínas de fusión heteromultímeras de ubiquitina se proporciona mediante síntesis química de las proteínas.
- 45 9. Una genoteca de ADN que contiene ADN que codifica una población de proteínas de fusión heteromultímeras de ubiquitina procedente de ubiquitinas monómeras, comprendiendo cada proteína multímera dos o más monómeros de ubiquitina modificados, enlazados entre sí en una disposición de cabeza a cola en donde al menos dos de cada uno de dichos monómeros de dicha proteína multímera están modificados de forma diferente al menos por sustituciones de aminoácidos expuestos en la superficie en al menos tres aminoácidos localizados en las posiciones 2, 4, 6, 8, 62, 63, 64, 65, 66 y 68 de SEQ ID NO: 1, teniendo dicha proteína monómera modificada una identidad de se-
- 50

cuencia aminoacídica de al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% con la proteína ubiquitina no modificada.

10. Un banco de proteínas de ubiquitina heteromultímeras obtenible mediante la expresión de la genoteca de ADN según la reivindicación 9.

5 11. Una célula eucariota o procariota o una población de fagos que contienen el ADN o el banco de proteínas según la reivindicación 9 o 10.

12. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de ubiquitina heteromultímera de dicho banco de proteínas según la reivindicación 10.

13. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 12.

Figura 1: La recombinación del monómero frontal del clon 41B10 con un monómero posterior diferente condujo a un incremento de la afinidad así como de la especificidad

Figura 1A: Selección primaria de SPW28-41B10

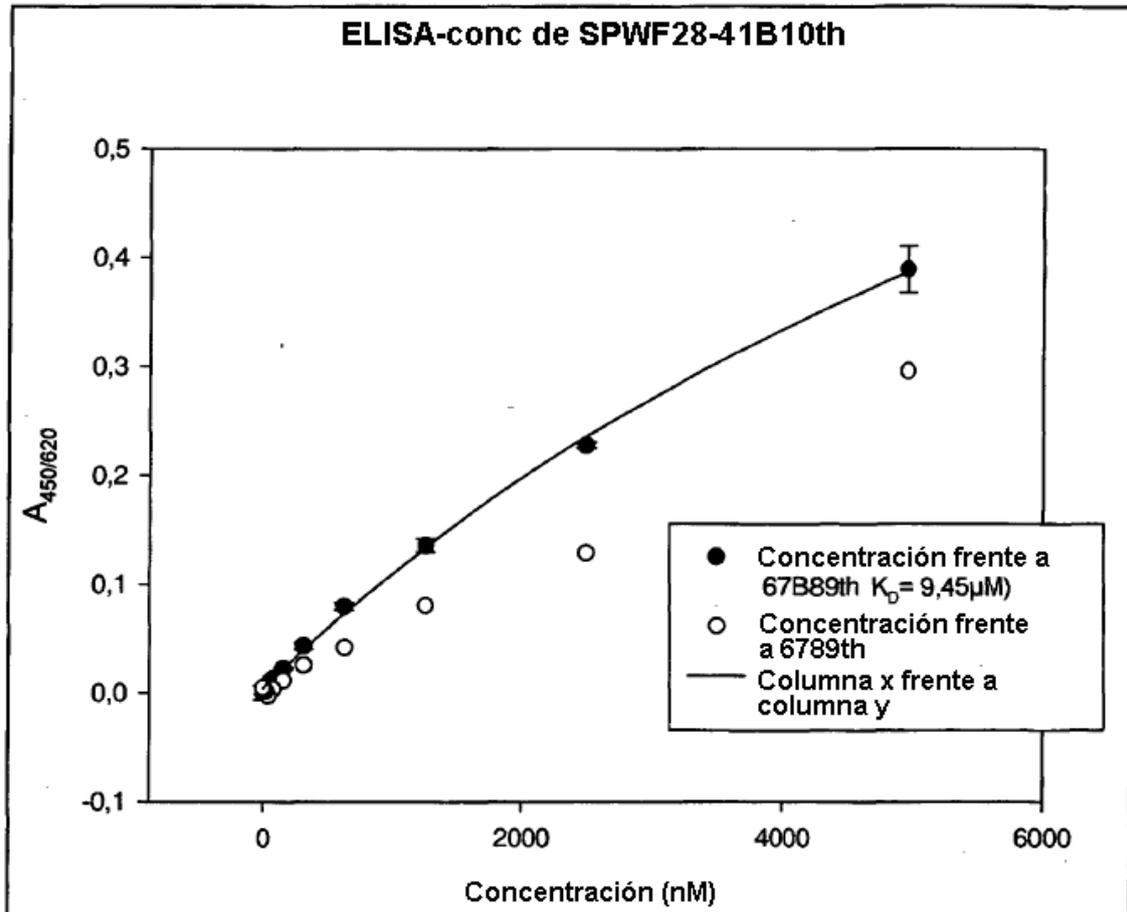
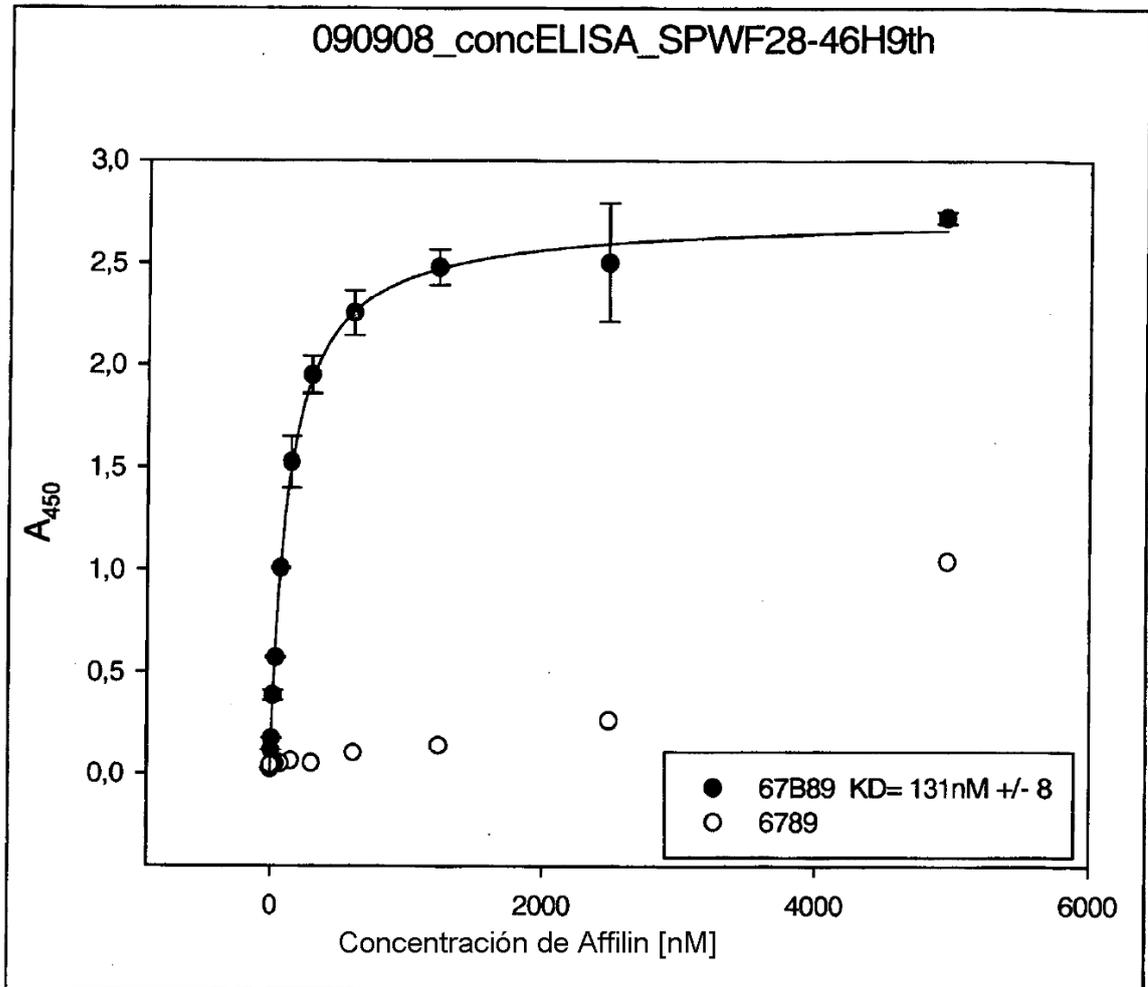


Figura 1B: Después de la recombinación con un monómero posterior diferente (SPWF28-46H9)



Affilin = concentración de proteína que se une a ED-B basada en ubiquitina modificada

Figura 2 - Afinidad y Actividad de una Molécula Dímera de proteína que se une a ED-B basada en ubiquitina Modificada fusionada con una Citocina

- Actividad que induce apoptosis de la fusión de citocina Affilin[®] $CE_{50} 0,78 \pm 0,24$ pM
- Actividad que induce apoptosis de citocina libre $CE_{50} 3,14 \pm 3,59$ pM

Figura 2 A muestra la afinidad elevada del heterodímero modificado 24H12 que se une a ED-B basado en ubicuitina (K_d 50,7 nM = $50,7 \times 10^{-9}$ M).

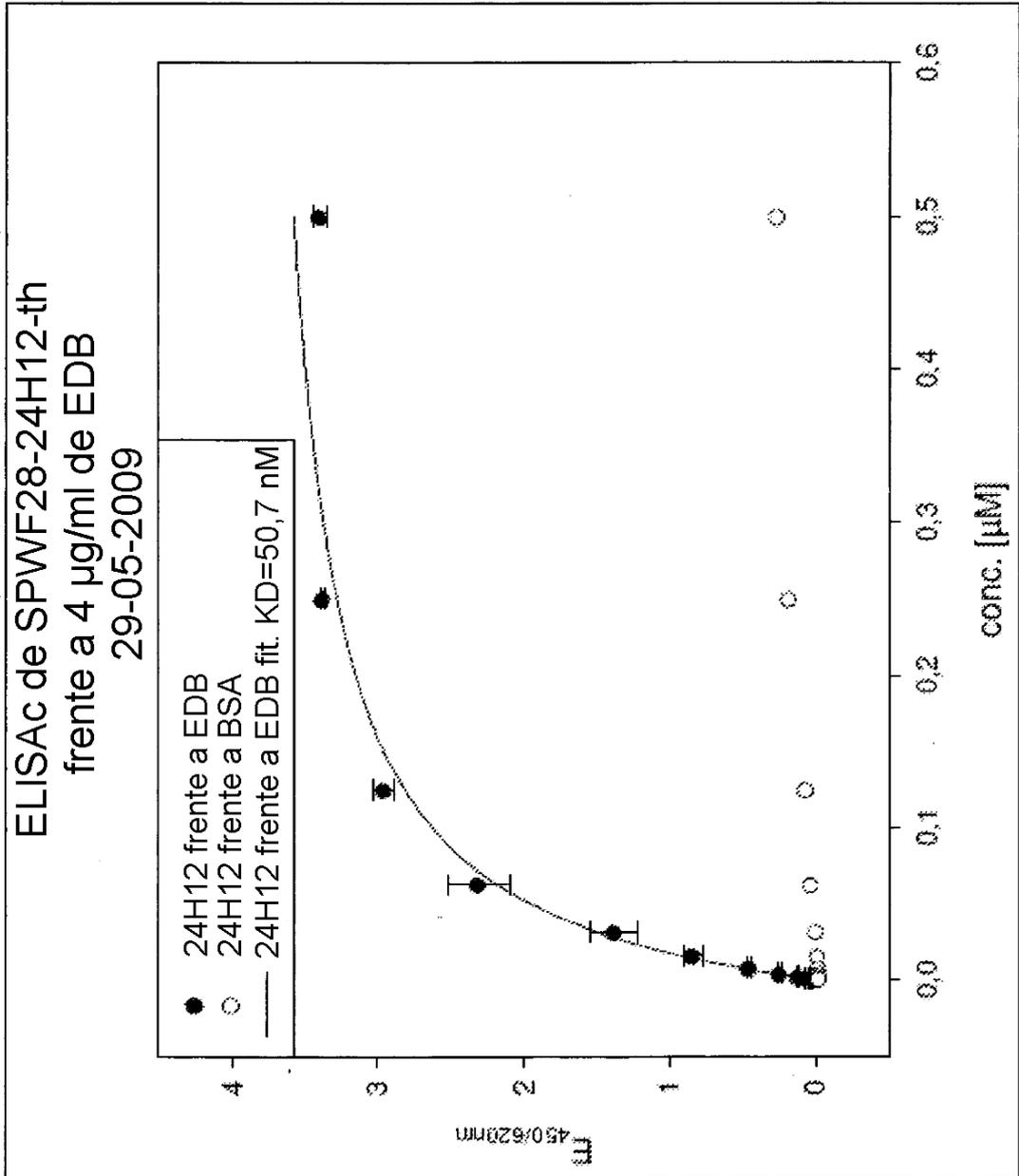


Figura 2 B muestra la afinidad incrementada del heterodímero modificado 24H12 que se une a ED-B basado en ubicuitina fusionado con citocina TNFalfa que da como resultado una multimerización del heterodímero (K_d 5,6 nM = $5,6 \times 10^{-9}$ M).

ELISA de SPWF28-24H12-t0a 15-07-2009

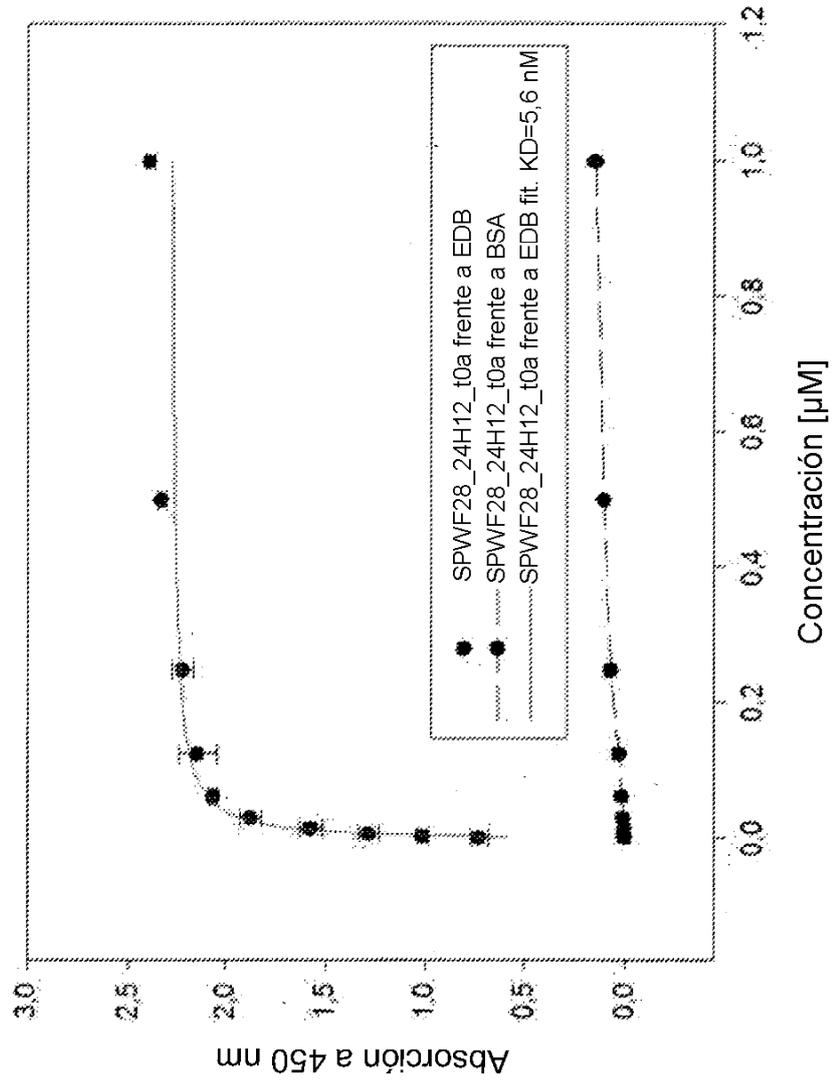


Figura 2 C Análisis de candidatos procedentes de la selección de la genoteca de dímeros, por ejemplo, 9E12 22D1 24H12 41B10

| Variante | Diana ED_B | | | | Diana c-FN | |
|--------------|----------------------|--|-------------------------------------|---------------------|------------|----------------------|
| | K _D ELISA | Biacore | | | | K _D ELISA |
| | | K _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹) | K _{off} (s ⁻¹) | K _D (nM) | | |
| 9E12 | 9,5 nM | No determinable | No determinable | No determinable | 61,2 nM | |
| 22D1 | 594 nM | - | - | - | 711 nM | |
| 24H12 | 50,7 nM | - | - | - | 286 nM | |
| 41B10 | 310 nM | 293 | 1,82 · 10 ⁻⁴ | 623 nM | 280 nM | |

Figura 2D

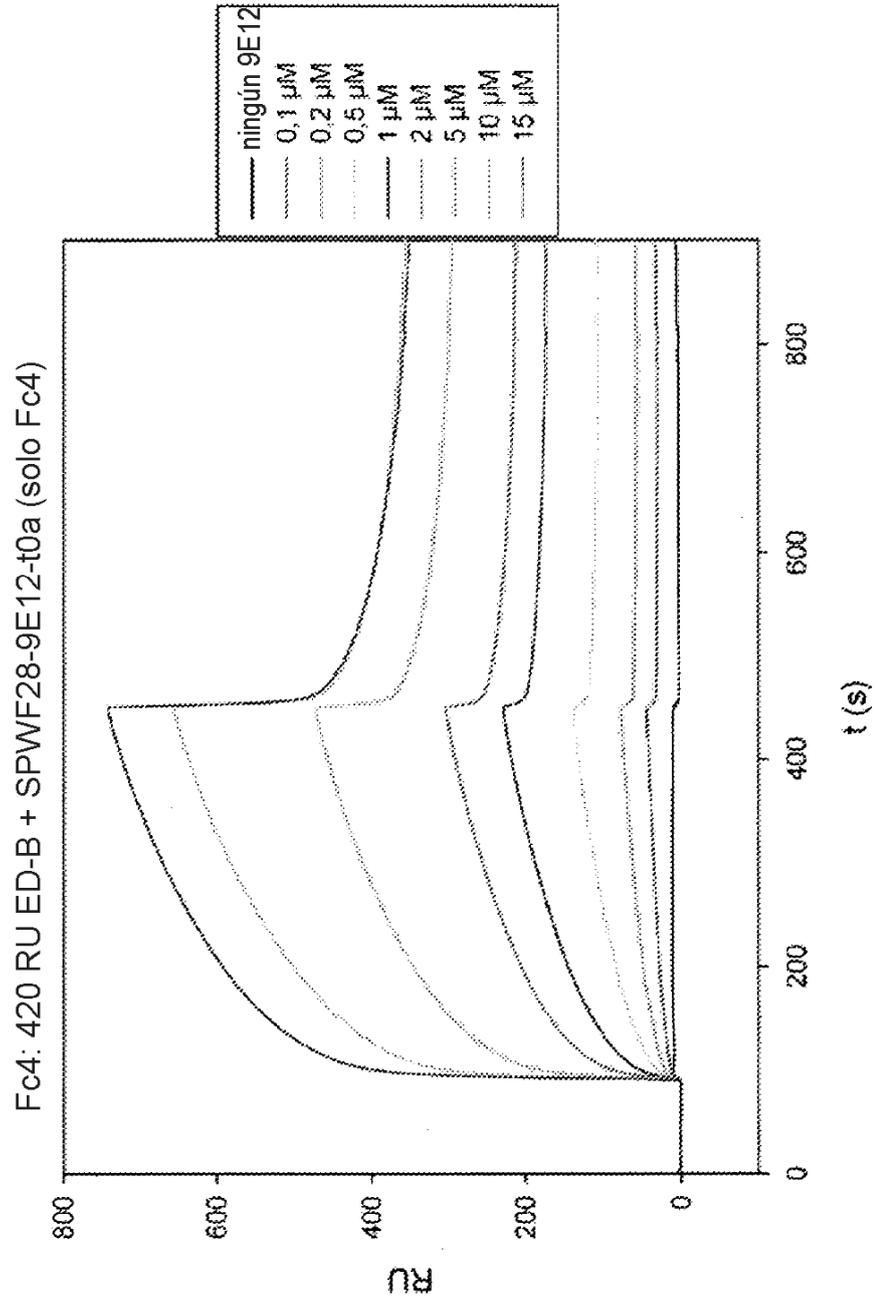


Figura 2E

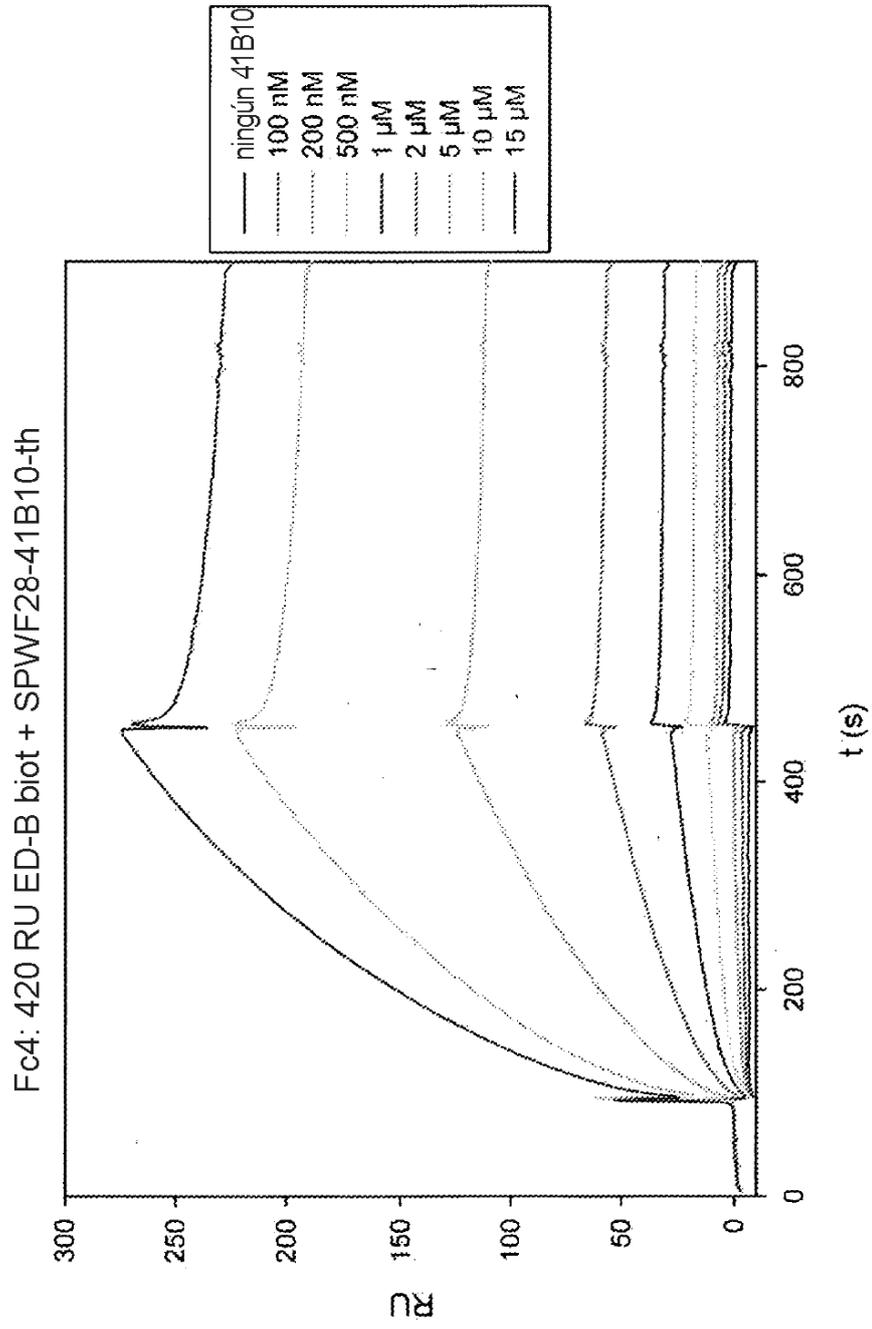


FIGURA 3: Contribución de monómeros diferentes a la afinidad de la unión y la especificidad

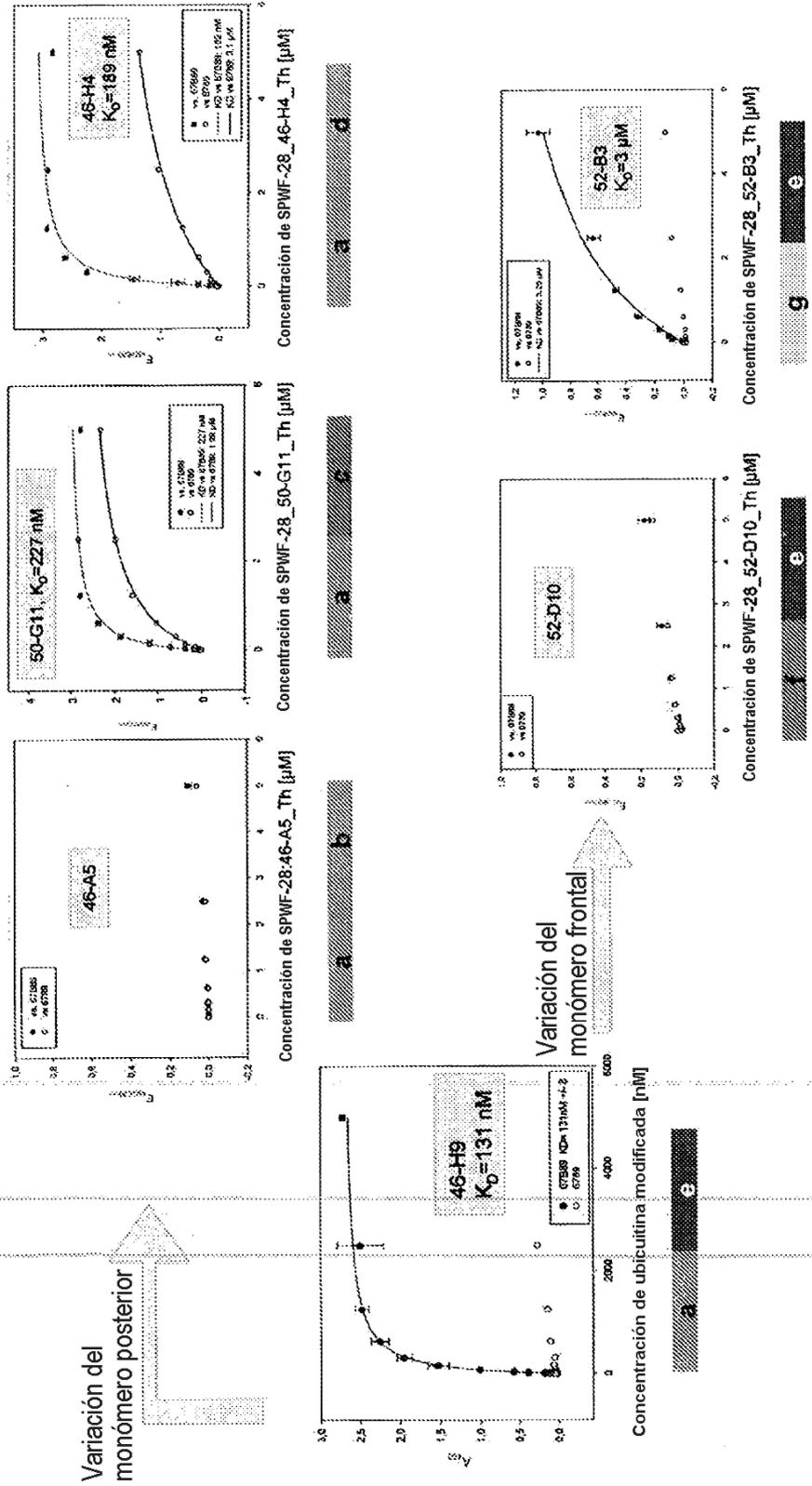


FIGURA 5: Comparación de la secuencia de la variante 1041-D11 con ubiquitina

| | | |
|------------------|-----|--|
| 1041-D11_TsX9 | 1 | MQIFVVTWTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLFWAGKQLEDGRTLSDYNI |
| Ub2_TsX9 | 1 | MQIFVKLTIGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLFWAGKQLEDGRTLSDYNI |
| Ubi-Dimer wt (Pr | 1 | MQIFVKLTIGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLFWAGKQLEDGRTLSDYNI |
| Ubi-Monomer wt | 1 | MQIFVKLTIGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLFWAGKQLEDGRTLSDYNI |
| 1041-D11_TsX9 | 61 | IQRKFP LHLVLRRLRGGGIGMRFVTTQTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQ |
| Ub2_TsX9 | 61 | IQKESTLHLVLRRLRGGGIGMRFVVKLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQ |
| Ubi-Dimer wt (Pr | 61 | IQKESTLHLVLRRLRGG---MQIFVKLTIGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQ |
| Ubi-Monomer wt | 61 | IQKESTLHLVLRRLRGG----- |
| 1041-D11_TsX9 | 121 | RLFWAGKQLEDGRTLSDYNIWSNVELHLVLRRLRAA |
| Ub2_TsX9 | 121 | RLFWAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRAA |
| Ubi-Dimer wt (Pr | 118 | RLFWAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLRGG |
| Ubi-Monomer wt | | ----- |

Figura 6

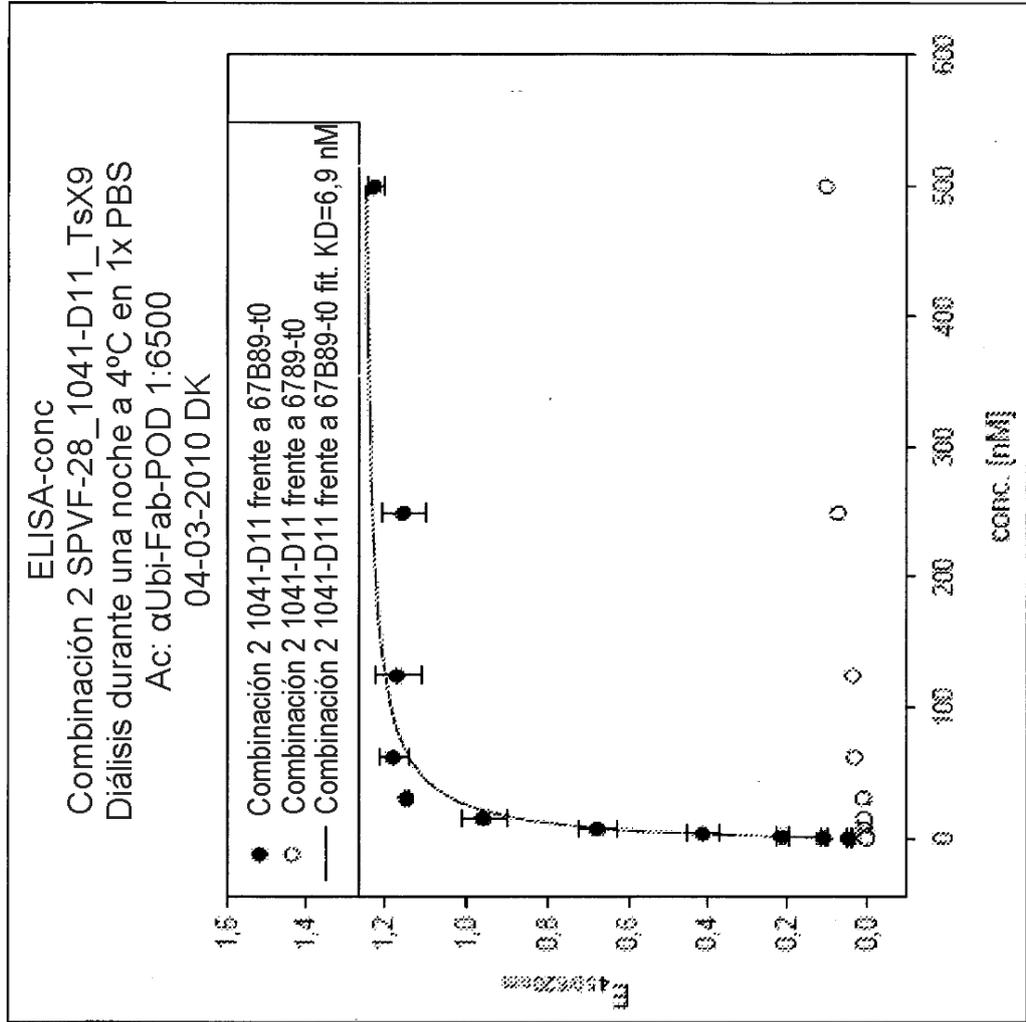


Figura 7

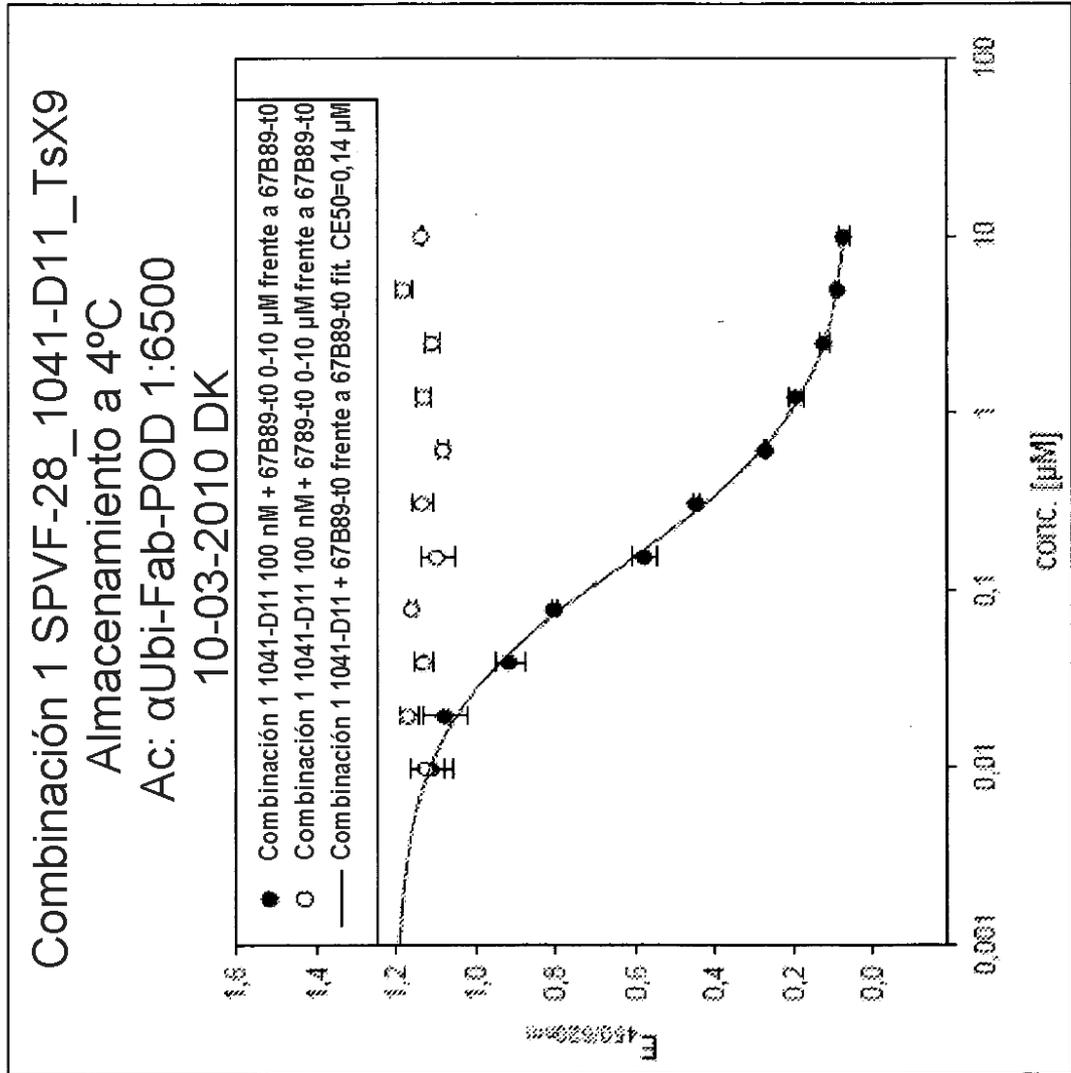


Figura 8

Fc2: 460 RU 67B89_TOL1 (Chip SA)
 + Combinación 2 SPVF-28_1041-D11_TsX9 (TG 23-3-10)
 en 1x PBST al 0,005%

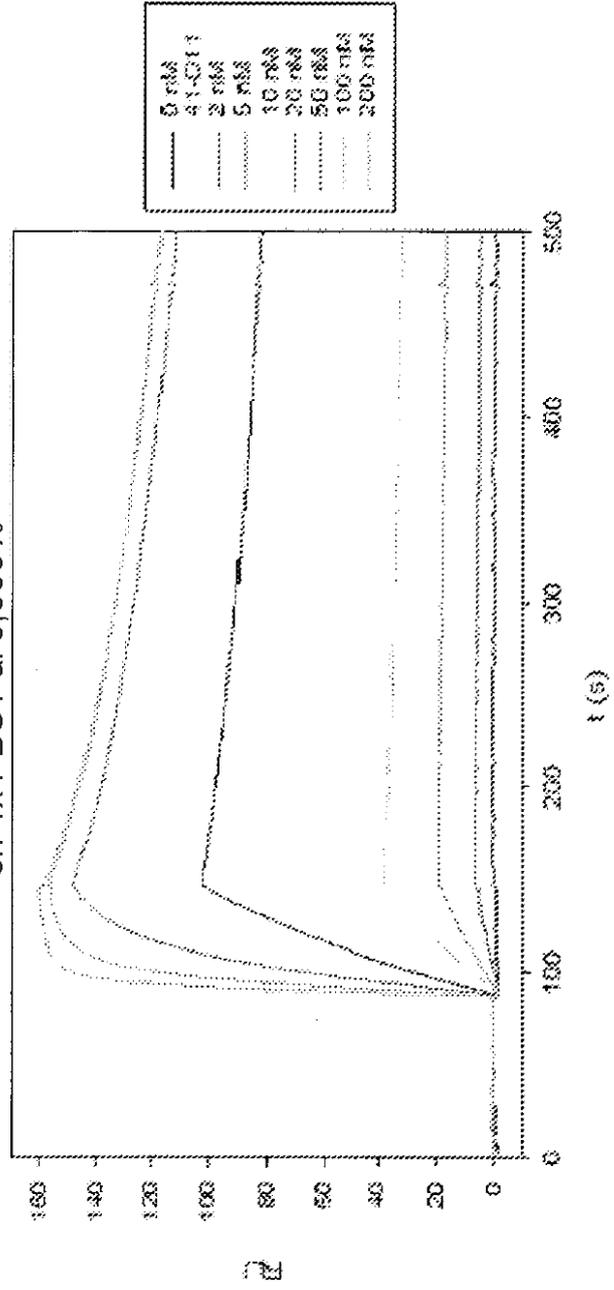


Figura 9

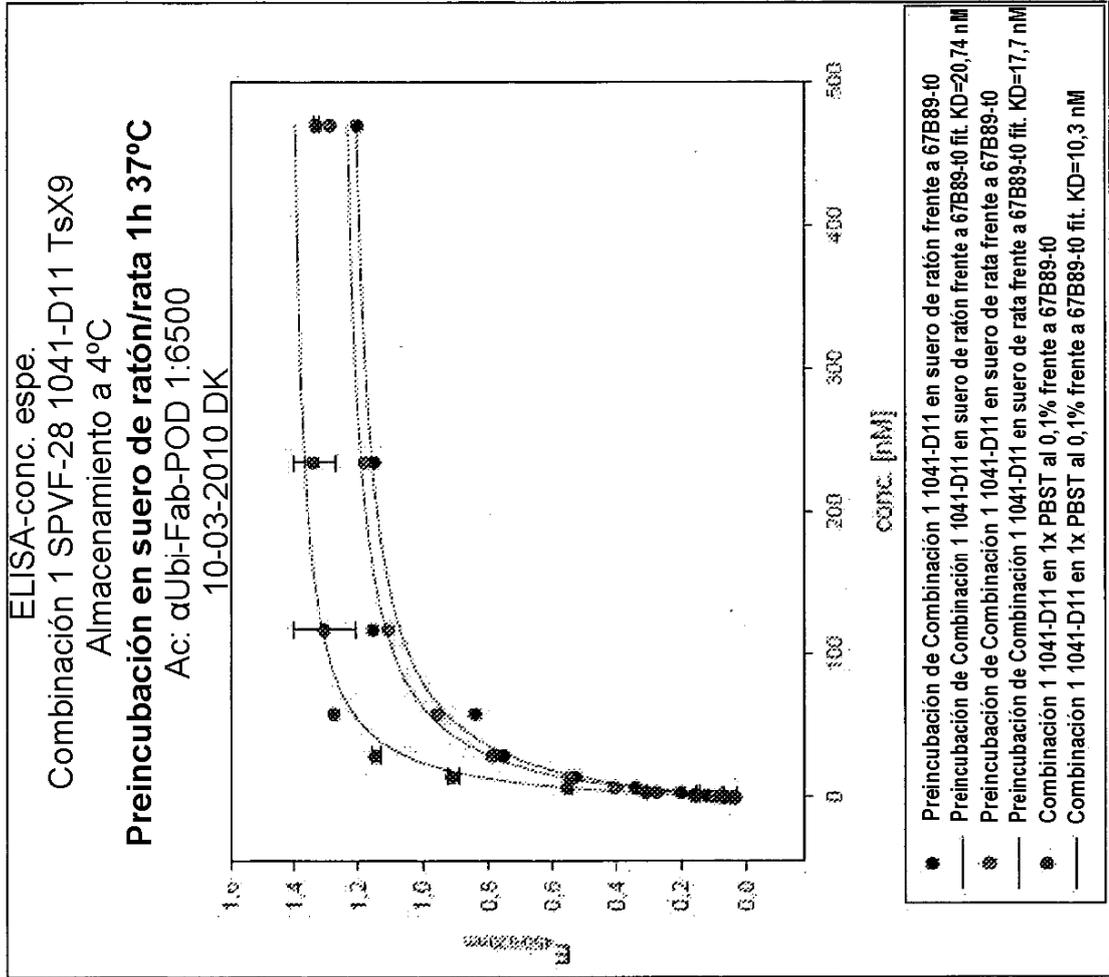


Figura 10
4. SE-HPLC.
Fig. 10 A **Complejo con ED-B (67B89)**

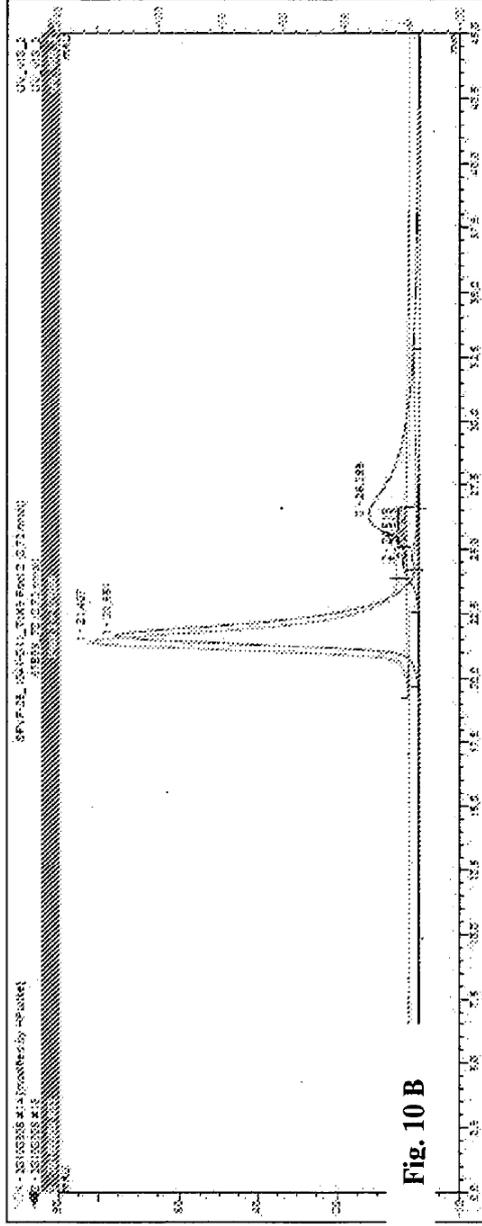


Fig. 10 B

Fig. 10 B **Sin complejo con el testigo (6789)**

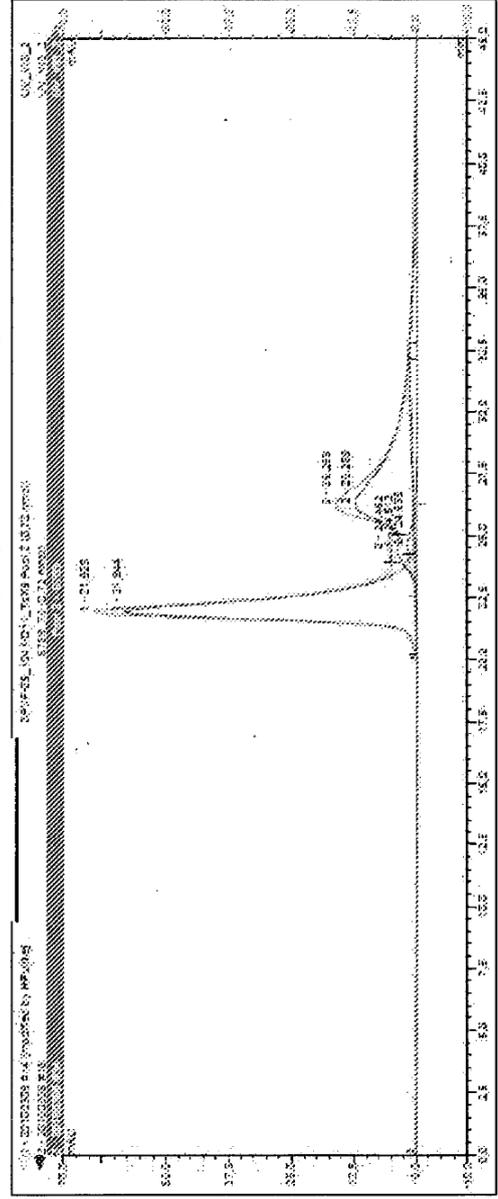


Figura 12

```

1111-B4_21231 1  nqifvgrvsktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-B4_21231 1111-B4_21231
1111-C9_21265 1  nqifvgrvsktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-C9_21265 1111-C9_21265
1111-E10_21315 1  nqifvefrfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-E10_21315 1111-E10_21315
1111-F6_21331 1  nqifvprwtgkltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-F6_21331 1111-F6_21331
1111-H12_21391 1  nqifvefrfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-H12_21391 1111-H12_21391
1111-H2_21371 1  nqifvefrfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-H2_21371 1111-H2_21371

1111-B4_21231 89  nqifvrmfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyiketgvl1111-B4_21231 89
1111-C9_21265 89  nqifvrmfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyiketgvl1111-C9_21265 89
1111-E10_21315 80  nqifvrfetgkltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyikrnpel1111-E10_21315 80
1111-F6_21331 80  nqifvprwtgkltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyiketgvl1111-F6_21331 80
1111-H12_21391 80  nqifvrmfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyiketgvl1111-H12_21391 80
1111-H2_21371 80  nqifvrmfktltilevpsdrtenvskiqkkgppdgrllwackqlsdgrtladyiketgvl1111-H2_21371 80

```

Figura 13

| | ID-Clon | BDR1 | Enlazador | BDR2 | Intercambio |
|-----------------------|---------|----------|----------------|----------|-------------|
| SPVF-31_1111-E10_TsX9 | 21315 | ef gwnpe | -----gggig | re lmgvv | |
| SPVF-31_1111-C9_TsX3 | 21265 | gv krspe | aaagggggggggig | zm etgvy | |
| SPVF-31_1111-B4_TsX3 | 21231 | gv krspe | aaagggggggggig | zm etgvy | TSA |
| SPVF-31_1111-F6_TsX9 | 21331 | pw qprti | -----gggig | yt llval | |
| SPVF-31_1111-H2_TsX9 | 21371 | ef gwnpe | -----gggig | zm etgvy | |
| SPVF-31_1111-H12_TsX9 | 21391 | ef gwnpe | -----gggig | zm etgvy | G86E |

Figura 14

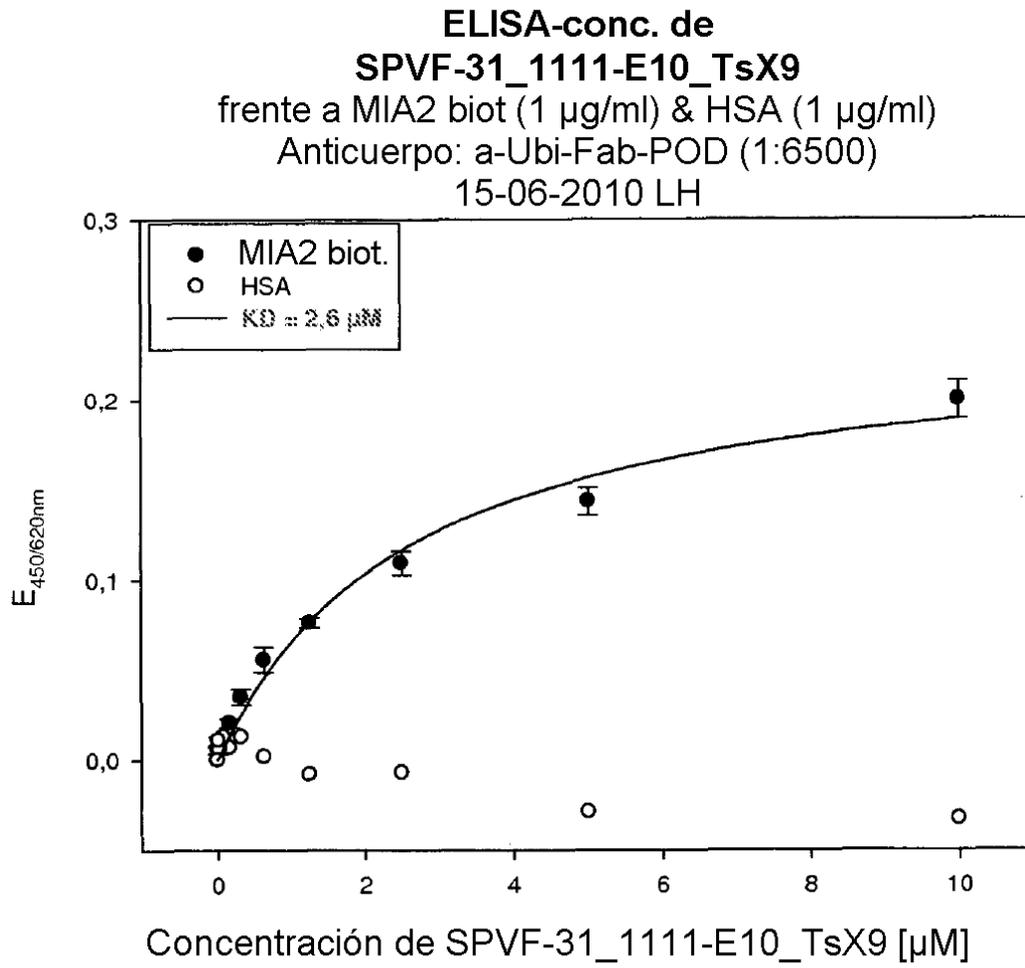


Figura 15A

Parte A: Modificaciones en el primer monómero de ubiquitina

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66

6-A12 1
 mfiyvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniphypriqlvlrlrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 68

16-A4 1
 myivvltltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniipqmaihlvrirrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 72-74 y opcionalmente 29

7-D1 1
 mmiyvltltgkttilevepsdtienvkaelqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniptdallhlvrirrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66

14-D11 1
 mliivgtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniptvnaihlvrirrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66

12-E6 1
 mliivriltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldynigrgtalhlvrirrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66

12-G9 1
 mfiwvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldynirsttmihlvrirrgsgggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 42, 44, 68, 70, 72-74 y opcionalmente 5 posiciones adicionales

1144-D11 1
 mqifvktltgkttilevepsdtienveaklqkdegippdqgrlihfagkqledgrtlldyniqkestlslilgvwaa-----

Modificaciones en las posiciones 42, 44, 68, 70, 72-74 y opcionalmente 3 posiciones adicionales

1144-E9 1
 mqifvktltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrlihfagkqledgrtlldyniqkestlklgltgfaa-----

Modificaciones en las posiciones 62-66, 70, 72-74

1076-H4 1
 mfiyvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniphypriqlklkhsaasggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1081-B11 1
 mfiyvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniphypriqlqlkhdasggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1081-H11 1
 mfiyvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniphypriqlqlksdasggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1082-A10 1
 mfiyvvtltgkttilevepsdtienvkaklqkdegippdqgrliwagkqledgrtlldyniphypriqlqlksdasggsg
 gggig

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1082-A11 1
mflyvvtllgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdyniphyprlqkiklqsqaasggggsg
gggiq

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1088-A5 1
mflyvvtllgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdyniphyprlqkiklaaasggggsg
gggiq

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1091-A2 1
mflyvvtllgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdyniphyprlqkhlhhaasggggsg
gggiq

Modificaciones en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 70, 72-74

1094-D9 1
mflyvvtllgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdyniphyprlqkikhhaasggggsg
gggiq

Parte B: Modificaciones en el segundo monómero de ubicuitina

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

6-A12 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilttgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

16-A4 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilrtgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

7-D1 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilthgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

14-D11 89
mqifvvtatgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilrtgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

12-E6 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilatgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

12-G9 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilrtgpihlvlrlrsg

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 27, 62-66

1144-D11 77
mqifvetdtgkttilevepsdtienveakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynigtdaahlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 27, 62-66

1144-ES 77
mqifvetitgkttilevepsdtienveakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdyniydqslhlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1076-H4 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilttgpihlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1081-B11 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilttgpihlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1081-H11 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilttgpihlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1082-A10 89
mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakiqdkiegippdqqrliwagkqledgrrtisdynilttgpihlvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1082-A11 89

mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakigdqkegippdqgrliwagkqledgrtledynilttgpilhvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1088-A5 89

mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakigdqkegippdqgrliwagkqledgrtledynilttgpilhvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1091-A2 89

mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakigdqkegippdqgrliwagkqledgrtledynilttgpilhvlrlraa

Modificaciones en las posiciones 6, 8, 62-66

1094-D9 89

mqifvvtetgkttilevepsdtienvkakigdqkegippdqgrliwagkqledgrtledynilttgpilhvlrlraa

FIGURA 15 B. Unión a TNFalfa de heterodímeros basados en ubiquitina modificados

Figura A. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodimera SPWF-15_6-A12 con especificidad hacia TNFalfa. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66, 68 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG

MFTYVVLTLGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWAGKQLEDGRTLSDYNIIPHYPRLO
 LVLRLRGGSGGGSGGGGIGMOIFVVTETGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWAGK
 QLEDGRTLSDYNIILTTGPLHLVLRRLRGG

FIGURA 15 C. El ELISA dependiente de la concentración determina la unión con alta afinidad de Kd 12 nM a TNF-alfa

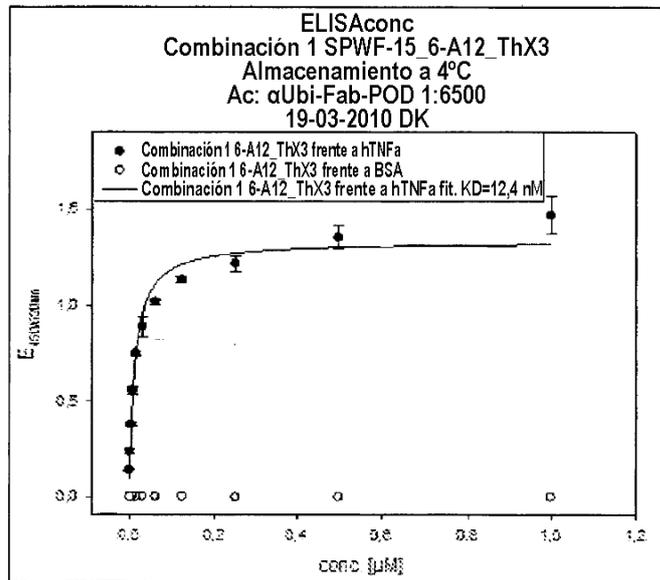


FIGURA 15 D. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodimera SPWF-15_16-D4_Th con especificidad hacia TNFalfa. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

SPWF-15_16-D4_Th

NYIVVLLTLGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWAGKQLEDGRTLSDYNIIPQMALH
 LVLRLRGGSGGGSGGGGIGMOIFVVTETGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWAGK
 QLEDGRTLSDYNIILRTGPLHLVLRRLRGG

FIGURA 15 E. El ELISA dependiente de la concentración determina la unión de alta afinidad de Kd 1,7 nM a TNF-alfa.

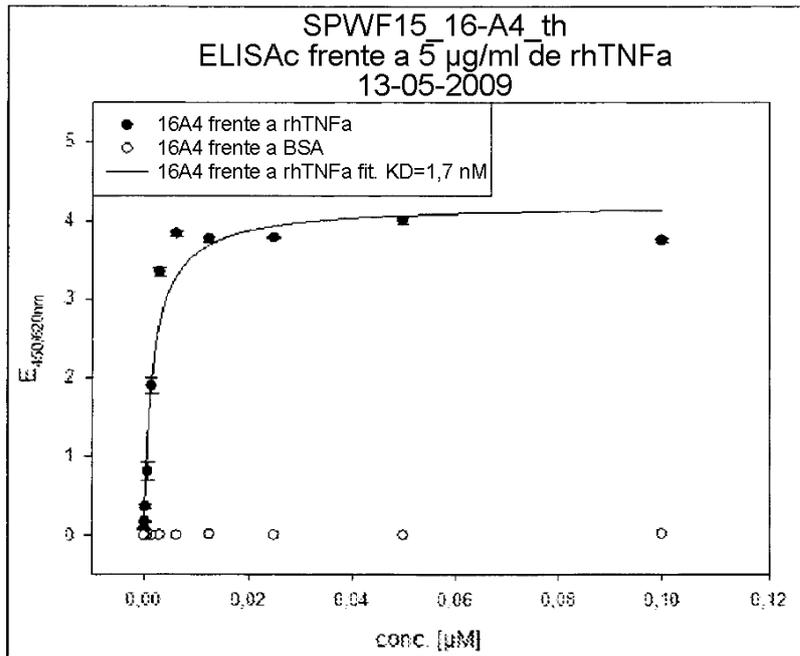


FIGURA 16. Unión a NGF de heterodímeros modificados basados en ubiquitina

Figura A. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPWF-9_1-B7_th con especificidad hacia NGF. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 y en la posición 51 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

SPWF-9_1-B7_th

MMISVYTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPFPDQORLIWAGKQLDDGRTLSDYNIERSGLLH
 LVLRLRGGSGGGGSGGGGIGMQIFVLTHTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPFPDQORLIWAGK
 QLEDGRTLSDYNIHSRTHLHLVLRGG

FIGURA B: El ELISA dependiente de la concentración determina una afinidad de Kd 0,9 µM hacia NGF

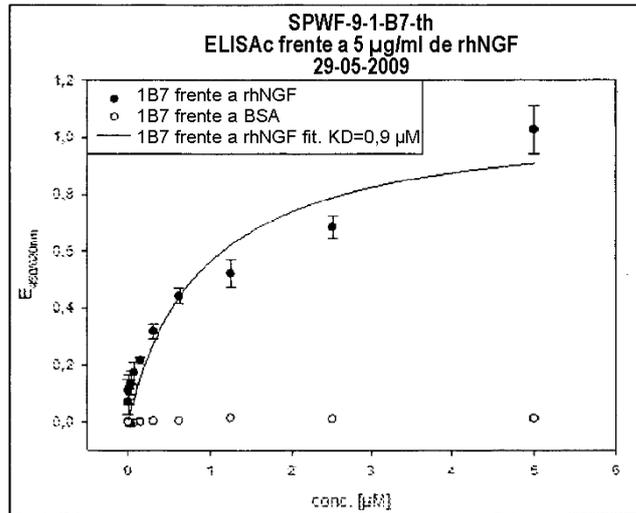


FIGURA C. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPWF-9_6-A2_th con especificidad hacia NGF. Las modificaciones están en las posiciones 2, 4, 6, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGGSGGGGIG.

SPWF-9_6-A2_th

MAIVVYTLTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPFPDQORLIWAGKQLEDGRTLSDYNI PMPVLLH
 LVLRLRGGSGGGGSGGGGIGMQIFVNTSTGKTTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPFPDQORLIWAGK
 QLEDGRTLSDYNI DQORILHLVLRGG

FIGURA D. El ELISA dependiente de la concentración determina una afinidad de K_d 180 nM hacia NGF
 La K_d era difícil de determinar ya que la señal disminuía a concentraciones elevadas.

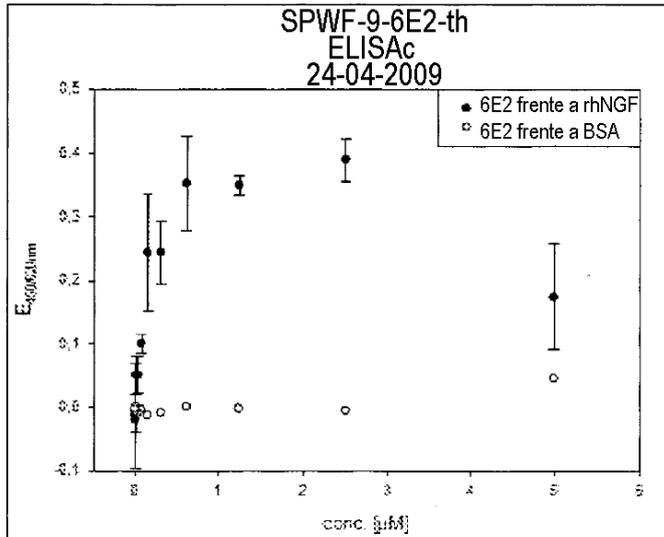


FIGURA 17 Proteínas heterodímeras que se unen a IgG

Figura A. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPVF-4_16-B2_ts con especificidad hacia IgG. Las modificaciones están en las posiciones 6, 8, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGSGGGGIG.

SPVF-4_16-B2_ts

MQIFVDILTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWACKQLEDGRTLSDYNIILIEWLLH
LVLRLRGGSGGGSGGGGIGMQIFVDILTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWACK
QLEDGRTLSDYNI GADAPLHLVLRRLRGG

FIGURA B: El ELISA dependiente de la concentración determina una afinidad de K_d 3,8 μ M hacia IgG

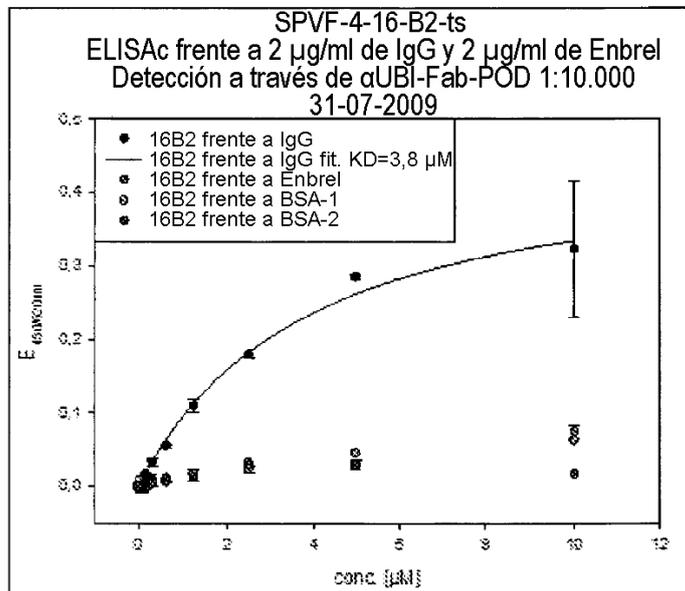


FIGURA C. Secuencia de la proteína de unión de ubiquitina heterodímera SPVF-4_9-C6_ts con especificidad hacia IgG. Las modificaciones están en las posiciones 6, 8, 62-66 del primer monómero de ubiquitina y en las posiciones 6, 8, 62-66 en el segundo monómero. El enlazador entre los dos monómeros de ubiquitina: SGGGSGGGGIG.

SPVF-4_9-C6_ts

MQIFVDIDITGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWACKQLEDGRTLSDYNIITFNPQLH
LVLRLRGGSGGGSGGGGIGMQIFVWITITGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIWACK
QLEDGRTLSDYNI PHWRILHLVLRRLRGG

FIGURA D. El ELISA dependiente de la concentración determina una afinidad de K_d 4,1 μ M hacia IgG

