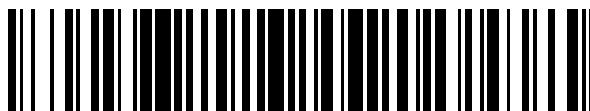


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 192**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009** **E 09737920 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 2274012**

54 Título: **Inmunoglobulina citotóxica**

30 Prioridad:

02.05.2008 EP 08450068

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

03.09.2014

73 Titular/es:

**F-STAR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNGS-
UND ENTWICKLUNGSGES.M.B.H (100.0%)
Schwarzenbergplatz 7
1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**HIMMLER, GOTTFRIED;
MUDDE, GEERT;
BAUER, ANTON;
REDL, GERDA;
RUEKER, FLORIAN;
WOZNIAK-KNOPP, GORDANA y
WOISETSCHLAEGER, MAXIMILLIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 490 192 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

Inmunoglobulina citotóxica

- 5 La invención se refiere a una inmunoglobulina citotóxica.

Los anticuerpos monoclonales se han usado ampliamente como agentes de unión terapéuticos. La estructura básica de los anticuerpos se explicará en el presente documento usando como ejemplo una inmunoglobulina IgG 1 intacta.

- 10 Dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos ligeras (L) idénticas se combinan para formar la molécula de anticuerpo con forma de Y. Cada una de las cadenas pesadas tiene cuatro dominios. Los dominios variables (VH) en el extremo amino son las puntas de la Y. A estos les siguen tres dominios constantes: CH1, CH2, y el CH3 en el extremo carboxi, y la base del tallo de la Y. Un tira corta, la zona de intercambio, conecta las regiones constantes y variables de la cadena pesada. La bisagra conecta CH2 y CH3 (el fragmento Fc) con el resto del anticuerpo (los fragmentos Fab). Un Fc y dos fragmentos Fab idénticos se pueden producir mediante escisión proteolítica de la bisagra en una molécula de anticuerpo intacta. Las cadenas ligeras están formadas por dos dominios, el variable (VL) y el constante (CL), separados por una zona de intercambio.

- 20 Los puentes disulfuro en la región bisagra conectan las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas mediante puentes disulfuro adicionales. Los restos de hidratos de carbono unidos por Asn están unidos en diferentes posiciones en los dominios constantes en función de la clase de inmunoglobulina. Para la IgG 1, dos puentes disulfuro en la región bisagra, entre los pares Cys235 y Cys238, unen las dos cadenas pesadas. Las cadenas ligeras se acoplan a las cadenas pesadas mediante dos puentes disulfuro adicionales, entre las Cys229 en los dominios CH1 y las Cys214 en los dominios CL. Los restos de hidratos de carbono están unidos a la Asn306 de cada CH2, de modo que se genera un saliente pronunciado en el tallo de la Y.

- 30 Estas características tienen profundas consecuencias funcionales. Las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras (VH) y (VL) residen en las "puntas" de la Y, en las que están colocadas para reaccionar con el antígeno. Esta punta de la molécula es el lateral sobre el cual se localiza el extremo N de la secuencia de aminoácidos. El tallo de la Y se proyecta de un modo para mediar con eficacia en las funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la interacción con los receptores Fc, o ADCC y ADCP. Sus dominios CH2 y CH3 sobresalen para facilitar la interacción con las proteínas efectoras. El extremo C de la secuencia de aminoácidos se localiza en el lado opuesto de la punta, que puede denominarse "parte inferior" de la Y.

- 35 En los anticuerpos se encuentran dos tipos de cadenas ligeras, denominadas lambda (X) y kappa (k). are found in antibodies. Una inmunoglobulina dada tiene cadenas k o cadenas X, nunca una de cada. No se han hallado diferencias funcionales entre los anticuerpos que tienen cadenas X o k.

- 40 Cada dominio en una molécula de anticuerpo tiene una estructura similar de dos láminas beta empaquetadas fuertemente una contra otra en un barril beta antiparalelo comprimido. Esta estructura conservada se denomina el pliegue de la inmunoglobulina. El pliegue de la inmunoglobulina de los dominios constantes contiene una lámina de 3 hebras empaquetada contra una lámina de 4 hebras. El pliegue se estabiliza con puentes de hidrógeno entre las hebras beta de cada lámina, mediante enlaces hidrofóbicos entre los residuos de las láminas opuestas en el interior y mediante un puente disulfuro entre las láminas. La lámina de 3 hebras comprende hebras C, F y G, y la lámina de 4 hebras tiene hebras A B, E, y D. Las letras A a la G indican las posiciones secuenciales de las hebras beta a lo largo de la secuencia de aminoácidos del pliegue de inmunoglobulina.

- 50 El pliegue de los dominios variables tiene 9 hebras beta dispuestas en dos láminas de 4 y 5 hebras. La lámina de 5 hebras es estructuralmente homóloga a la lámina de 3 hebras de los dominios constantes, pero contiene las hebras adicionales C' y C". El resto de las hebras (A, B, C, D, E, F G) tienen la misma topología y una estructura similar a la de sus homólogos en los pliegues de inmunoglobulina del dominio constante. Un puente disulfuro une las hebras B y F en láminas opuestas, como en los dominios constantes.

- 55 Los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas contienen tres bucles hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Las tres CDR de un dominio V (CDR1, CDR2, CDR3) se agrupan en un extremo del barril beta. Las CDR son bucles que conectan las hebras beta B-C, C'-C", y F-G del pliegue de inmunoglobulina. Los residuos en las CDR varían de una molécula de inmunoglobulina a la siguiente, de modo que se confiere especificidad a cada anticuerpo.

- 60 Los dominios VL y VH en las puntas de las moléculas de anticuerpo están estrechamente empaquetados de modo que las 6 CDR (3 en cada dominio) colaboran en la construcción de una superficie (o cavidad) para la unión específica de antígeno. Por tanto, el sitio de unión al antígeno natural de un anticuerpo está compuesto por los bucles que conectan las hebras B-C, C'-C", y F-G del dominio variable de la cadena ligera y las hebras B-C C'-C", y F-G del dominio variable de la cadena pesada.

65

Los bucles que no son bucles de CDT en una inmunoglobulina nativa o que no forman parte de la cavidad de unión a antígeno determinada por los bucles de CDR y, opcionalmente, bucles adyacentes dentro de la región del bucle de la CDR, no tienen especificidad de unión a antígeno o de unión a epítipo, pero contribuyen al correcto plegamiento de la totalidad de la molécula de inmunoglobulina y/o su función efectora o de otro tipo y, por tanto, se denominan bucles estructurales para los fines de la presente invención.

Documentos de la técnica anterior muestran que hasta ahora se ha usado el armazón de tipo inmunoglobulina con el fin de manipular el sitio de unión a antígeno existente, de modo que se introducen nuevas propiedades de unión. En la mayoría de los casos, las regiones CDR se han modificado mediante ingeniería para la unión al antígeno, en otras palabras, en el caso del pliegue de inmunoglobulina, solo el sitio de unión a antígeno natural se ha modificado con el fin de cambiar la afinidad o especificidad de unión. Existe una gran cantidad de bibliografía que describe diferentes formatos dichas inmunoglobulinas manipuladas, con frecuencia expresadas en forma de fragmentos Fc monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab, bien expresados sobre la superficie de partículas de fagos o expresados de forma soluble en varios sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

El documento W006/072620A1 describe un procedimiento de modificación por ingeniería de una inmunoglobulina que comprende una modificación en una región bucle estructural para obtener nuevos sitios de unión a antígeno. Este procedimiento es ampliamente aplicable a las inmunoglobulinas y se puede usar para producir una bibliotecas de inmunoglobulinas dirigidas a diversos antígenos. Se ha demostrado que una biblioteca de CH3 es útil para seleccionar ligantes específicos de un antígeno.

El documento WO08/003103A2 la adsorción de una biblioteca de CH3, CH1 o CL en un péptido sintético, que representa un mimotopo del antígeno CD20.

En la técnica se han propuesto varias bibliotecas de inmunoglobulina para obtener ligantes específicos de inmunoglobulinas. La técnica anterior hace referencia a la expresión monovalente monomérica de dominios de unión, por lo general, el documento WO9209690A2 describe partículas de fagemido que muestran una única copia de una proteína de fusión sobre la superficie de la partícula. De este modo, se describió la obtención de ligantes de alta afinidad a partir de una biblioteca de partículas de fagemido, también denominados bacteriófagos. Se proporcionan vectores de expresión replicable que comprenden genes que codifican un polipéptido de unión y una proteína de la cubierta del fago, para formar una fusión génica que codifica una proteína de fusión, que es una proteína quimérica de una partícula de fagemido, la proteína de la cubierta del fago y el polipéptido de unión.

El documento US5223409 describe en general el procedimiento de fusión de un gen que codifica una proteína de interés al dominio en el extremo N de la proteína de la cubierta III génica del fago filamentoso M13. La fusión génica se muta para formar una biblioteca de proteínas de fusión relacionadas estructuralmente que se expresan en cantidad baja sobre la superficie de una partícula de fagemido. Se usa selección y detección selectiva biológicas para identificar ligandos nuevos útiles como candidatos a fármacos.

Sin embargo, existen algunas limitaciones al uso de dicho "fago de fusión" o expresión en fago monovalente y las respectivas proteínas de fusión únicas. Muchos agentes biológicos están en la naturaleza en forma oligomérica. Para los fines de la presente invención, oligomérico significa dímérico, trimérico o incluso formas poliméricas más altas, de hasta 24 monómeros.

Se ha descrito que los fagos de fusión de acuerdo con la técnica anterior expresan proteínas de fusión monoméricas, principalmente porque se creía que los ligantes de afinidad más alta solo se podían seleccionar de una biblioteca si las partículas de fagemido expresan proteínas de fusión sencillas. No obstante, las proteínas nativas a menudo se ensamblan como un dímero o incluso en un grado de oligomerización más alto. Para obtener expresión dímica con una proteína de fusión sencilla se han desarrollado algunas técnicas que implican codones de terminación condicionales localizados entre la proteína de la cubierta y el polipéptido de unión (Dall'Acqua et al. The Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180). De este modo se expresan los monómeros solubles de los polipéptidos además de los fusionados al fago, y se permite la formación de un dímero. Sin embargo, dichos codones de terminación requieren la propagación en células huésped supresoras específicas que puedan traducir un codón de terminación a un aminoácido, para proporcionar una cantidad adecuada de proteínas de fusión además de los polipéptidos de unión solubles.

Las proteínas de fusión de la técnica anterior implican, en algunos casos, secuencias ligadoras para expresar polipéptidos de unión más grandes. Las secuencias ligadoras de hasta 24 aminoácidos normalmente se usan con fines convencionales de expresión de dominios variables de un anticuerpo. Véase, por ejemplo, el vector de expresión pCOMB3x (Hybrid. Hybridomics. 2003 Apr;22(2):97-108. Development of functional human monoclonal single-chain variable fragment antibody against HIV-1 from human cervical B cells. Berry JD, Rutherford J, Silverman GJ, Kaul R, Elia M, Gobuty S, Fuller R, Plummer FA, Barbas CF.)

Las inmunoglobulinas basadas en IgG 1 de longitud completa se han usado ampliamente para tratar a los pacientes que sufren tumores sólidos, en particular aquellos que sobreexpresan un receptor de la clase erbB. Entre estos receptores están e EGFR (Her1), Her2, Her2neu, Her3 y Her4.

Herceptin (trastuzumab, humAb4D5) es un producto basado en un anticuerpos monoclonal para usar en la terapia del cáncer de mama. El anticuerpo Herceptin es específico del epítipo 4D5 del dominio extracelular HER2 de her2neu (también denominado c- erbB-2 o MAC117).

El "dominio extracelular HER2" O "DEC HER2" se refiere a un dominio de HER2 que está fuera de una célula. anclado a una membrana celular, o en circulación. incluyendo fragmentos de los mismos, El dominio extracelular de HER2 puede comprender cuatro dominios: "Dominio I" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 1-195 "Dominio II" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 196-319), "Dominio III" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 320-488), y "Dominio IV" (residuos de aminoácidos de aproximadamente 489-630) (numeración de residuos sin péptido señal),

El epítipo 4D5 es la región en el dominio extracelular de HER2 al que se une el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y el trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2 y dentro del dominio IV de HER2. El epítipo 4D5 de HER2 abarca uno cualquiera o más residuos en la región de aproximadamente el residuo 529 a aproximadamente el residuo 625, incluido el DEC de HER2., incluyendo la numeración de residuos el péptido señal.

El EGFR es una glicoproteína monomérica grande (1.186 residuos) con una única región transmembrana y un dominio tirosina quinasa citoplasmático flanqueados por regiones reguladoras no catalíticas. Los análisis de secuencia han mostrado que el ectodominio (residuos 1-621) contiene cuatro subdominios denominados en el presente documento L1, CR1, L2 y CR2, en los que L y CR son acrónimos de grande (*large*) y rico en cisteína (CR), respectivamente. Los dominios L1 y L2 también se han denominado dominios I y III, respectivamente. Los dominios CR también se han denominado anteriormente dominios II y IV, o S1.1-S1.3 y S2.1-S2.3, en los que S es la abreviatura de pequeño (*small*).

Se han desarrollado AcMo frente al dominio externo del EGFR que rompen la unión al receptor y la posterior transducción de señal. Los anticuerpos de bloqueo específicos de EGFR se han caracterizado con mayor detalle *in vitro* y en la actualidad se usan en estudios clínicos; estos son mAbC225 (ERBITUX/cetuximab), mAb425 (EMD72000) y el AcMo humano ABX-EGF. C225 (Cetuximab/Erbitux) está aprobado por la FDA para el cáncer colorrectal metastásico y mAb425 (EMD59000), cuya versión humanizada (EMD72000) está actualmente en ensayos clínicos de fase II para varios tipos de tumores sólidos que expresan EGFr. C225 se une a distintos epítopos sobre el dominio extracelular de EGFr. Se ha demostrado la unión independiente de ambos anticuerpos al receptor silvestre y al receptor mutante (EGFrVIII), que principalmente se expresa en células tumorales. Cetuximab interacciona exclusivamente con el dominio III de la región extracelular de EGFR (sEGFR), de modo que obstruye particularmente la región de unión al ligando sobre este dominio e impide estéricamente la dimerización del receptor.

El receptor mutante del EGF de origen espontáneo se demostró por primera vez en el glioblastoma. Conocido como EGFRvIII, esta molécula representa una delección de los exones 2 a 7 en el dominio extracelular del receptor del EGF. Esto elimina 273 aminoácidos y crea una nueva glicina en la unión de la fusión. El EGFRvIII (denominado de forma variable 2-7 EGFR o delta EGFR) tiene una delección dentro del marco del dominio extracelular y se encuentra en numerosos tipos de tumores humanos.

El documento WO9720858A1 se refiere a anticuerpos anti-Her2 que inducen apoptosis en células que expresan Her2. Por tanto, los anticuerpos monoclonales (AcMo) que se unen a Her2 se generan inmunizando ratones con Her2 soluble purificado.

El documento WO06087637A2 se refiere a anticuerpos que reconocen Her2/neu y ejercen un efecto antiproliferativo sobre las células que expresan Her2/neu. Este documento describe un anticuerpo aislado o un fragmento, variante o derivado del mismo, en particular, el fragmento Fab humano, y el fragmento scFv, capaces de unirse específicamente a Her2neu, sin embargo, sin actividad citotóxica.

Algunas divulgaciones de la técnica anterior se refieren a formatos de anticuerpo con potencial para inhibir el crecimiento tumoral, en ausencia de actividades citotóxicas, tales como ADCC,

Rovers et al (Cancer Immunol. Immunother. (2007) 56:303-317 describen nanocuerpos anti-EGFR con potencial para inhibir el crecimiento de células tumorales.

El documento WO03/075840A2 divulga anticuerpos que se unen a KDR con una afinidad comparable o superior a la que muestran por el VEGF humano y que neutralizan la activación de KDR, entre ellos los Fab monovalentes que neutralizan la activación de KDR, de modo que inhiben la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

Se han propuesto otros fragmentos de Inmunoglobulina para terapia humana.

La solicitud de patente WO06036834A2 describe un péptido biológicamente activo incorporado como secuencia interna en la región bucle de un dominio Fc; la memoria se refiere a una molécula de la cual la secuencia peptídica interna se puede añadir mediante inserción o sustitución de aminoácidos en el dominio Fc existente previamente, Un péptido de ejemplo está dirigido a p185HER2/neu.

Los péptidos dirigidos a Her2/neu los han descrito Park et al Nat. Biotechnol. (2000) 18(2):194-8. Aunque las afinidades de unión al péptido normalmente están en el límite inferior con una K_D superior a 10^{-6} M, el mimético peptídico exocíclico anti- HER2/neu ejerció una afinidad anormalmente alta ($K_D=300$ nM).

El documento WO01/01748A2 describe compuestos peptídicos que se unen al producto génico erbB2 con afinidades de unión bajas. Una proteína de fusión péptido de ejemplo-Fc dirigida a erbB2 se analizó en ensayos de unión competitiva, en los que se usan como competidores una cantidad baja del mismo tipo de péptidos, lo que tiene como resultado un valor de CI_{50} bajo que, sin embargo, no sería indicativo de un valor de K_D o de CE_{50} , como se determina en un ensayo de saturación.

Es objetivo de la presente invención proporcionar mejores productos de inmunoglobulinas que se unen a superficies celulares.

El objetivo se alcanza con la materia sujeto conforme a lo reivindicado.

Sumario de la invención

La presente invención es tal como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se describe un anticuerpo modular citotóxico con un peso molecular de hasta 60 kDa, que se une específicamente a una superficie celular diana con una afinidad de unión de $K_D < 10^{-8}$ M, preferentemente en el intervalo nanomolar o inferior. La elevada afinidad del anticuerpo modular es, por tanto, de pequeño tamaño con la ventaja de una fácil penetración a través de una capa de células o tumor, para efectuar la lisis celular o la muerte celular en el sitio en el que se sobreexpresa la diana. Como alternativa, el anticuerpo modular puede tener una $CI_{50} < 10^{-8}$ M, como se determina en un ensayo de unión de saturación.

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención ejerce al menos uno de ADCC, ADPC, o CDC.

La actividad citotóxica del anticuerpo modular de acuerdo con la invención está determinada, preferentemente, por sus funciones efectoras, medidas mediante al menos una de las actividades ADCC, ADPC y CDC.

Un anticuerpo modular puede ser un oligómero de dominios del anticuerpo modular, en particular un oligómero de dominios de inmunoglobulina, o un fragmento de una inmunoglobulina de longitud completa. El anticuerpo puede ser un dímero seleccionado del grupo que consiste en los dímeros de VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, Fc y Fab, o cadenas sencillas de los mismos.

Un anticuerpo modular puede contener un sitio de unión que tiene una secuencia de anticuerpo aleatorizada y/o al menos un sitio de unión dentro de una región bucle estructural, que siempre se entiende que incluye potencialmente una secuencia de dominio terminal que podría estar contribuyendo a la unión al antígeno. El sitio de la secuencia de anticuerpos aleatorizada puede estar dentro de la región CDR o de la región de bucle estructural. Por tanto, la unión a una diana o a un ligando funcional, tal como una molécula efectora, que puede ser un ligando estructural, es posible incluso a través de una inmunoglobulina sin región CDR, o un sitio además de una región CDR.

El sitio de unión diana en la superficie celular puede localizarse en la región CDR, y el sitio de unión con especificidad por un ligando funcional o un ligando estructural está dentro de la región bucle estructural.

Como alternativa, el sitio de unión con especificidad por un ligando funcional o un ligando estructural puede estar dentro de la región bucle CDR y el sitio de unión de la diana en la superficie celular localizado en una región bucle estructural.

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención tiene propiedades de unión específicas para unirse a una diana, que es un receptor de la clase erbB, tal como el seleccionado del grupo que consiste en EGFR, Her2, Her2neu, HER3 y HER4. Los anticuerpos modulares preferidos de acuerdo con la invención se proporcionan para usar en el tratamiento de pacientes que sufren un tumor sólido, en los que el tumor expresa un receptor de la clase erbB,

Son particularmente preferidos los anticuerpos modulares anti-Her2 que contienen una secuencia de aminoácidos dentro de EF, el bucle de una región bucle estructural, en los que la secuencia se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID N° como se indican en las tablas 4 y 5, que están opcionalmente contenidas en un bucle EF y/o AB y/o CD.

Aunque había una prolongada necesidad de anticuerpos altamente eficaces pero de de pequeño tamaño, por primera vez fue posible obtener dicho anticuerpo modular de acuerdo con la invención, usando una biblioteca de dominios de anticuerpo modular, en particular una biblioteca de un oligómero de dominios de anticuerpo modular que se unen a un ligando efector. Determinados miembros de dicha biblioteca tienen ambas propiedades. la unión a la diana y la unión al ligando efector, como requisito previo para citotoxicidad biológica o citolisis. También se prefiere que el formato de un armazón de anticuerpo modular no se modifique produciendo variantes y bibliotecas de dicho armazón, por tanto, los miembros de la biblioteca seguirían manteniendo el formato funcional como determina la unión a un ligando armazón.

De acuerdo con la invención se proporciona adicionalmente un método de producir un anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

- a. proporcionar una biblioteca de un oligómero de dominios de anticuerpo modular,
- b. poner en contacto dicha biblioteca con dicha diana en presencia de un ligando efector,
- c. seleccionar un miembro de la biblioteca que tenga ambas propiedades,

- (i) afinidad por la unión a la diana de $K_d < 10^{-8}$ M o $CI_{50} < 10^{-8}$ M, y
- (ii) actividad citotóxica. y

- d. fabricar una preparación del anticuerpo modular, como se expone en las reivindicaciones.

Los métodos de selección preferidos proporcionan la unión simultánea de ambos, la diana y el ligando efector, que supone una ventaja para una citólisis eficaz. La unión simultánea se determina, preferentemente, en un ensayo basado en células, con diferenciación bidimensional, por ejemplo en un sistema de FACS.

Preferentemente, los miembros de la biblioteca contienen una secuencia de anticuerpo aleatorizada, en los que el sitio de mutagénesis está dentro de la región bucle estructural, que potencialmente incluye una secuencia terminal.

La biblioteca como se usa en el método de la invención se produce, preferentemente, de acuerdo con un diseño que proporciona mutagénesis además de sitios de unión que interaccionan con el ligando efector. Por tanto, preferentemente se usa una biblioteca de calidad elevada, como se determina mediante medidas de control de la calidad usando ensayos de unión a la molécula efectora o unión al ligando armazón.

El método preferido de acuerdo con la invención comprende además la etapa de maduración de la afinidad para aumentar la afinidad de unión por la diana en la superficie celular. Esta maduración de la afinidad se realiza, preferentemente, mediante mutagénesis de una inmunoglobulina seleccionada que tiene una especificidad de unión determinada para unirse a la diana. sin producir reacciones cruzadas con las proteínas control, aún teniendo una afinidad media o baja. Preferentemente, un miembro de la biblioteca que tiene una afinidad de unión con una CI_{50} o $K_d < 10^{-6}$ M también se mutageneiza para proporcionar un ligante de afinidad madurada o un conjunto de dichos ligante, es decir, una biblioteca de ligante de afinidad madurada con una afinidad mayor con una CI_{50} o $K_d < 10^{-7}$ M, preferentemente con una CI_{50} o $K_d < 10^{-8}$ M, o incluso en el intervalo nanomolar o inferior. En este caso, se prefiere que el anticuerpo modular de acuerdo con la invención siga siendo funcional con respecto a su efecto citotóxico.

También se divulga un método de preparación de un anticuerpo modular de acuerdo con la invención para tratar a un paciente que sufra un tumor sólido, en el que el tumor expresa un receptor de la clase erbB,

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención es, preferentemente, para usar en el tratamiento de un paciente que sufre un tumor sólido, en el que el tumor expresa un receptor de la clase erbB,

Figura:

Figura 1:

Presentación esquemática de las PCR usadas para la producción de los fragmentos usados para montar la biblioteca Fcab01. Los cebadores de la PCR están indicados por flechas con su respectiva orientación 5'-3', y las líneas verticales indican las posiciones aproximadas para los sitios de restricción introducidos que se usaron para el ensamblaje del gen mutado. Los sitios de restricción están contenidos en los cebadores para las uniones de los fragmentos de la PCR.

Figura 2:

Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de un dominio CH3 (IMGT, numeración). El esquema de aleatorización se proporciona para las bibliotecas Fcab01 a Fcab06. Las posiciones aleatorizadas en el bucle AB y EF están marcadas con un círculo. X representa los 20 aminoácidos, z es solo Ala Asp, Ser, Tyr.

Figura 3:

estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1 (secuencia de aminoácidos)

Figura 4:

IgG humana que incluye modificaciones de aminoácidos aleatorizadas (secuencia de aminoácidos)

Figura 5:

secuencia de aminoácidos de FcabRGD4L (secuencia de aminoácidos)

Figura 6:

vector pHENFcabRGD4 (secuencia de nucleótidos)

Figura 7:

vector pHENFcabRGD4L (secuencia de nucleótidos)

Figura 8 (SEC ID N° 15):

vector pHENFcabRGD4L (secuencia de nucleótidos)

Figura 9 (SEC ID N° 16):

vector pYD1dXFc (secuencia de nucleótidos)

Figura 10 (SEC ID N° 17):

pYD1CH12 (secuencia de nucleótidos)

Figura 11 (SEC ID N° 18):

Fcab01 (secuencia de nucleótidos)

Figura 12 (SEC ID N° 19):

Fcab02 (secuencia de nucleótidos)

Figura 13 (SEC ID N° 20):

Fcab03 (secuencia de nucleótidos)

Figura 14 (SEC ID N° 21):

Fcab04 (secuencia de nucleótidos)

Figura 15 (SEC ID N° 22):

Fcab05 (secuencia de nucleótidos)

Figura 16 (SEC ID N° 23):

Fcab06 (secuencia de nucleótidos)

Figura 17 (SEC ID N° 72):

vector pYD1 (secuencia de nucleótidos)

Figura 18 (SEC ID N° 73):

vector pYD1Nhe modificado (secuencia de nucleótidos)

Figura 19 (SEC ID N° 74):

vector pYD1Ink (secuencia de nucleótidos)

Figura 20 (SEC ID N° 75):

vector pYD1mata (secuencia de nucleótidos)

Figura 21 (SEC ID N° 76):

vector pYD1gal (secuencia de nucleótidos)

Figura 22 (SEC ID N° 77):

4D5H (secuencia de nucleótidos)

Figura 23 (SEC ID N° 78):

4D5L (secuencia de nucleótidos)

Figura 24 (SEC ID N° 79):

vector pYD4D5hc (secuencia de nucleótidos)

Figura 25 (SEC ID N° 80):

4D5hp (secuencia de aminoácidos)

Figura 26 (SEC ID N° 81):

vector pYD4D5hl (secuencia de nucleótidos)

Figura 27 (SEC ID N° 82):

4D5lp (secuencia de aminoácidos)

Figura 28 (SEC ID N° 427):

plásmido pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt (secuencia de nucleótidos)

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos específicos como se usan a lo largo de la memoria tienen los significados siguientes.

El término "inmunoglobulina" como se usa de acuerdo con la presente invención se define como polipéptidos o proteínas que pueden exhibir propiedades mono o bi o multiespecíficas, o de unión mono bi o multivalentes, preferentemente al menos dos, más preferentemente al menos tres sitios de unión específicos para epítomos de, por ejemplo, antígenos, moléculas efectoras o proteínas de origen patógeno o de estructura humana, como autoantígenos que incluyen proteínas asociadas a células o séricas. El término inmunoglobulina como se usa en el presente documento también incluye fragmentos funcionales de un anticuerpo, tales como Fc, Fab, scFv, dímeros monocatenarios de los dominios CH1/CL, Fv, dímeros como VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, como cadenas sencillas de pares de dominios de inmunoglobulina. La definición también incluye dominios de las cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como dAb, Fd, VI, Vk, Vh, VHH) y la región constante o dominios individuales de un anticuerpo intacto, tal como CH1, CH2, CH3, CH4, CI y Ck, así como minidominios que consisten en al menos dos hebras beta de un dominios de inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

"Anticuerpos modulares" como se usan en el presente documento se definen como moléculas de unión a antígeno, como anticuerpos humanos, compuestas por al menos un módulo polipeptídico o dominio proteico, preferentemente en la forma natural. La expresión "anticuerpos modulares" incluye moléculas de unión a antígeno que son inmunoglobulinas, proteínas similares a inmunoglobulinas, u otras proteínas que exhiben formatos modulares y propiedades de unión a antígeno similares a las inmunoglobulinas o anticuerpos, que se pueden usar como armazones de unión a antígeno, preferentemente basados en proteínas humanas.

La expresión "molécula similar a inmunoglobulina" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier proteína de unión a antígeno, en particular a una proteína humana, que tiene una estructura de dominio que puede construirse de una forma modular. Las moléculas similares a inmunoglobulinas pueden ser receptores de linfocitos T (TCR) o partes solubles de los mismos, fibronectina, transferrina, CTLA-4, receptores antigénicos monocatenarios, por ejemplo los relacionados con los receptores de linfocitos T y anticuerpos, miméticos de anticuerpos, adnectinas, anticalinas, filómeros, proteínas de repetición tales como repeticiones de anquirina, avímeros, Versabodies™, moléculas basadas en la toxina del escorpión, y otros armazones proteicos que no son anticuerpos con propiedades de unión a antígeno.

Las repeticiones de anquirina (AR), repeticiones de armadillo (ARM), repeticiones ricas en leucina (LRR) y repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) son los miembros más importantes de la clase de proteínas de proteínas con repeticiones. Las proteínas con repeticiones están compuestas por unidades estructurales homólogas (repeticiones) que se apilan para formar dominios alargados. La interacción de unión normalmente está mediada por varias repeticiones adyacentes, lo que conduce a superficies de interacción con la diana grandes.

Los avímeros contienen dominios A como cuerdas de varios dominios en diversos receptores de superficie celular. Los dominios de esta familia se unen de forma natural sobre 100 dianas conocidas diferentes, incluyendo moléculas pequeñas, proteínas y virus. El análisis del truncamiento ha mostrado que una diana normalmente se pone en contacto mediante múltiples dominios A con cada dominio de unión de forma independiente a un epítipo único. La avididad generada combinando varios dominios de unión es un potente abordaje para incrementar la afinidad y la especificidad, que estos receptores han explotado durante la evolución.

Las anticalinas son proteínas humanas modificadas que derivan del armazón de la lipocalina con propiedades de unión prescritas típicas de los anticuerpos humanizados. Las lipocalinas comprenden 160-180 aminoácidos y forman proteínas del barril beta cónico con una cavidad de unión a ligando rodeada de cuatro bucles. Compuestos hidrófobos pequeños son los ligandos naturales de las lipocalinas y se han podido aislar diferentes variantes de la lipocalina con nuevas especificidades del compuesto (también denominadas "anticalinas" después de aleatorizar los residuos en esta cavidad de unión).

Los receptores antigénicos monocatenarios contienen un único dominio variable y son un 20 % más pequeños que los anticuerpos de dominio único de los camélidos.

Los filómeros son péptidos derivados de fragmentos proteicos naturales biodiversos.

Se entiende que la expresión "anticuerpo modular", "inmunoglobulina". "proteínas similares a inmunoglobulina" incluye también un derivado de los mismos. Un derivado es cualquier combinación de uno o más anticuerpos modulares de la invención y o una proteína de fusión en la que cualquier dominio o minidominio del anticuerpo modular de la invención se puede fusionar en cualquier posición de una o más de otras proteínas (tales como otros anticuerpos modulares, inmunoglobulinas, ligandos, proteínas armazón, enzimas, toxinas y similares). Un derivado del anticuerpo modular de la invención también se puede obtener mediante asociación o unión a otras sustancias mediante varias técnicas químicas, tales como acoplamiento covalente, interacción electrostática, puentes disulfuro etc. Las otras sustancias unidas a las inmunoglobulinas pueden ser lípidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas e inorgánicas, o cualquier combinación de las mismas (p. ej., PEG, profármacos o fármacos). Un derivado también comprendía un anticuerpo con la misma secuencia de aminoácidos pero formado completa o parcialmente por aminoácidos no naturales o modificados químicamente. El término derivado también incluye fragmentos y equivalentes funcionales. Los derivados preferidos todavía son funcionales con respecto a la unión a la diana y a la actividad citotóxica.

Un "bucle estructural" o un "bucle no CDR", como se usa en el presente documento, debe entenderse del siguiente modo: anticuerpos modulares, inmunoglobulinas o sustancias similares a inmunoglobulinas están formadas por dominios con un denominado pliegue de inmunoglobulina. En esencia, las láminas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión a un antígeno mediante el sitio de unión natural de un anticuerpo. Estos bucles se denominan bucles CDR. Los bucles CDR se localizan dentro de la región bucle CDR, que pueden, en algunos casos, también incluir parte de la región marco variable (denominada "VFR"), que es adyacente a los bucles CDR. Se sabe que algunos bucles del VFR pueden contribuir a la cavidad de la unión a antígeno de un anticuerpo, que por lo general está determinada principalmente por los bucles CDR. Por tanto, dichos bucles VFR se consideran parte de la región bucle CDR, y no se usarían adecuadamente para modificar los nuevos sitios de unión a antígeno. Los bucles al lado de la cavidad de unión a antígeno o región bucle CDR, denominados bucles estructurales o bucles no CDR. Al contrario que el VFR dentro de la región bucle CDR, o localizado proximal a los bucles CDR, otros bucles del VFR de los dominios variables se considerarían bucles estructurales. Estos son, preferentemente, bucles estructurales. del VFR localizado en oposición a la región bucle CDR, o en el lado C-terminal de un dominios de inmunoglobulina variable. Los dominios constantes tienen bucles estructurales. dentro de una región bucle estructural, por ejemplo, en el lado en C-terminal de un dominio de anticuerpo o en el lado N-terminal, incluso dentro de una cadena lateral de un dominio de anticuerpo. Los dominios constantes también se denominan parte de la región marco.

El término "antígeno" o "diana" como se usa en el presente documento incluirá, en particular, todos los antígenos y moléculas diana capaces de ser reconocidos por un sitio de unión de un anticuerpo modular. Antígenos específicamente preferidos como dianas por la molécula son los antígenos o moléculas que ya se ha demostrado que son o pueden ser inmunológica o terapéuticamente relevantes, especialmente aquellos para los que se ha probado la eficacia clínica.

El término "diana" o "antígeno" como se usa en el presente documento comprenderá, en particular, moléculas seleccionadas del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados con tumores, autoantígenos que incluyen

receptores de la superficie celular, enzimas, receptores Fc, FcRn, HSA, IgG, interleucinas o citocinas, proteínas del sistema del complemento, proteínas transportadoras, moléculas séricas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, también moléculas responsables de la encefalitis espongiforme transmisible (EET), tales como priones, infecciosos o no, y marcadores o moléculas relacionadas con afecciones inflamatorias, tales como factores proinflamatorios, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer, u otros haptenos.

La expresión "antígenos de la superficie celular" incluirá todos los antígenos capaces de ser reconocidos por una estructura de anticuerpo sobre la superficie de una célula, y fragmentos de dichas moléculas. Los antígenos de la superficie celular son los antígenos que ya se ha demostrado que son o pueden ser inmunológica o terapéuticamente relevantes, especialmente aquellos para los que se ha probado una eficacia clínica o preclínica. Ejemplos incluyen moléculas de la superficie celular que participan en la actividad de la muerte celular. Tras la unión de la inmunoglobulina de acuerdo con la invención, preferentemente, al menos dos de las moléculas de la superficie celular, el sistema inmunológico proporciona citólisis o muerte celular, por tanto, se puede proporcionar un medio potente para atacar a las células humanas.

El antígeno es reconocido como molécula diana entera o como un fragmento de dicha molécula, especialmente subestructuras de dianas, generalmente denominadas epítopos. Las subestructuras de los antígenos se denominan, por lo general, "epítopos" (p. ej., epítopos de linfocitos B, epítopos de linfocitos T), siempre que sean inmunológicamente relevantes, es decir son también reconocibles por anticuerpos naturales o monoclonales. El término "epítipo" como se usa en el presente documento se referirá, en particular, a una estructura molecular que puede formar completamente una pareja de unión específica o ser parte de una pareja de unión específica a un sitio de unión de un anticuerpo modular o una inmunoglobulina. El término epítipo puede también hacer referencia a haptenos. Químicamente, un epítipo puede estar compuesto por un hidrato de carbono, un péptido, un ácido graso, una sustancia orgánica, bioquímica o inorgánica, o derivados de los mismos y cualquier combinación de los mismos. Si un epítipo es un polipéptido, normalmente incluirá al menos 3 aminoácidos, preferentemente de 8 a 50 aminoácidos, y, más preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos en el péptido. No existe un límite superior crítico de la longitud del péptido, que pudiera comprometer a casi toda la longitud de una secuencia polipeptídica de una proteína. Los epítopos pueden ser epítopos lineales o conformacionales. Un epítipo lineal está compuesto por un único segmento de una secuencia primaria de una cadena polipeptídica. Los epítopos lineales pueden ser contiguos o solapantes. Los epítopos conformacionales están compuestos por aminoácidos juntados plegando el polipéptido para formar una estructura terciaria y los aminoácidos no son necesariamente adyacentes entre si en la secuencia lineal. Específicamente, los epítopos son, al menos, parte de moléculas relevantes en términos diagnósticos, es decir, la ausencia o presencia de un epítipo en una muestra se correlaciona de forma cualitativa o cuantitativa con una enfermedad o el estado de salud de un paciente o con un estado del proceso de fabricación o con el estado ambiental o de alimentación los epítopos pueden ser, al menos, parte de moléculas relevantes en términos terapéuticos, es decir, moléculas que pueden estar dirigidas por el dominio de unión específica que cambia la evolución de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que determina el ligando afín de interés en una población heterogénea de moléculas. Por tanto, en las condiciones indicadas (p. ej., condiciones de inmunoensayo), el anticuerpo modular se une a su diana concreta y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en una muestra. La unión específica significa que la unión es selectiva en términos de identidad de la diana, afinidad de unión o aversez alta, media o baja, según se seleccione. La unión selectiva normalmente se consigue si la unión constante o la dinámica de unión es, al menos, 10 veces diferente, preferentemente, la diferencia es de al menos 100 veces. y, más preferentemente, al menos 1.000 veces.

La expresión "sistema de expresión" se refiere a moléculas de ácido nucleico que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias control en unión operable, de modo que los huéspedes transformados o transfectados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Con el fin de efectuar la transformación, el sistema de expresión puede estar incluido en un vector, sin embargo, el ADN relevante puede también estar integrado en el cromosoma del huésped. Como alternativa, se puede usar un sistema de expresión para la transcripción/traducción in vitro.

Toda la numeración de las secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas es conforme al esquema de numeración de IMGT (IMGT, the international Immunogenetics, Lefranc et al., 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212).

La expresión "agente de unión" o "ligando" se refiere a un miembro de un par de unión, en particular polipéptidos de unión que tienen el potencial de servir como dominio de unión para una pareja de unión. Ejemplos de parejas de unión incluyen parejas de agentes de unión con interacciones funcionales, tales como receptores que se unen a ligandos, anticuerpos que se unen a antígenos o receptores, un fármaco que se une a una diana, u y enzimas que se unen a un sustrato.

La expresión "proteínas de fusión" o "proteínas de fusión quimérica" deberá significar la molécula compuesta por un paquete genético, al menos parte de una estructura de superficie externa, tal como una proteína de la cubierta, opcionalmente una secuencia ligadora, y un agente de unión. La proteína de fusión está codificada por un vector con el gen del agente de unión e información para expresar una copia del agente de unión en la superficie del paquete

genético.

El término "citotóxico" o "actividad citotóxica" se refiere a cualquier molécula específica dirigida contra antígenos naturales que, cuando se unen al antígeno, que activa la vía del complemento o activa a las células asesinas, lo que tiene como resultado lisis celular o desencadena apoptosis. En particular, se refiere a la actividad sobre las células efectoras que tienen como resultado la activación de los linfocitos T citotóxicos o células que median en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la fagocitosis celular (ADCP). También se refiere a un efecto apoptótico o de modo que se desencadena la muerte celular programada (PCD). Por tanto, los anticuerpos modulares de acuerdo con la invención matan las células diana recubiertas con anticuerpo, opcionalmente mediante la unión a los receptores Fc de las células efectoras o mediante la inducción de la muerte celular programada.

"Armazón" significará un marco temporal, natural o artificial, usado para soportar la estructura molecular de un polipéptido en la construcción de variantes o un repertorio del polipéptido. Normalmente, es un sistema modular de dominios polipeptídicos que mantiene la estructura terciaria o la función de la molécula parental. Ejemplos de armazones son anticuerpos modulares, que pueden mutageneizarse para producir variantes dentro de dicho armazón, para obtener una biblioteca.

La expresión "ligando estructural" significa un ligando que se une a un armazón o a la estructura de anticuerpos modulares, de modo que se determina la estructura molecular o la función primaria y la especificidad de dicho anticuerpo modular. En casos preferidos, el ligando estructural es un ligando funcional, que media en una función biológica tras la unión, como un ligando efector. En una realización alternativa, el ligando estructural es un ligando funcional, que es una diana específica unida por la región CDR o región bucle estructural. El mismo ligando estructural se puede unir a muchas variantes de un anticuerpo modular con independencia de sus especificidades por la diana. Por lo general, la presencia de un sitio de unión al ligando estructural indica que la variante se expresa y se pliega de forma correcta. Por tanto, la unión del ligando estructural a su sitio de unión proporciona un método para preseleccionar, coseleccionar, caracterizar y detectar de forma selectiva polipéptidos funcionales de un repertorio de polipéptidos. El diseño de variantes de anticuerpos modulares que conservan la propiedad de unión a un ligando estructural evita la preparación de variantes que son no funcionales, por ejemplo, como resultado de la introducción de mutaciones, mutantes de plegamiento o mutantes de expresión que serían o son incapaces de unirse a sustancialmente cualquier diana o ligando efector. Dichos mutantes no funcionales en ocasiones se generan mediante la aleatorización normal y procedimientos de variación usados en la construcción de repertorios de polipéptidos. Proporcionar mutantes funcionales que se unen a un ligando estructural permite al experto en la técnica preparar una biblioteca de anticuerpos modulares que está enriquecida en miembros de la biblioteca funcionales, bien plegados y altamente expresados. Por ejemplo, el armazón puede ser un Fab parental y al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 40 % de las variantes del Fab parental se unen a la CDR-diana de dicho Fab parental.

La expresión "ligando efector" significa un ligando que participa en las funciones efectoras, como una molécula efectora. Ejemplos de ligandos efectores son receptores Fc o moléculas similares a receptores Fc que interfieren en las inmunoglobulinas. Un receptor Fc es una proteína que se encuentra sobre la superficie de determinadas células, incluyendo las células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, y mastocitos, que contribuyen a las funciones protectoras del sistema inmunológico. Su nombre deriva de su especificidad de unión para una parte de un anticuerpo conocido como la región Fc (fragmento cristalizante). Los receptores Fc se unen a los anticuerpos que están unidos a las células infectadas o patógenos invasores. Su actividad estimula las células fagocíticas o citotóxicas para destruir microbios, o células infectadas por la fagocitosis celular mediada por anticuerpos (ADCP) o citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpos (ADCC). Existen varios tipos diferentes de receptores Fc., que se clasifican basándose en el tipo de anticuerpos que reconocen, por ejemplo, los que se unen a la clase más frecuente de anticuerpos, IgG, se denominan receptores Fc-gamma (FcγR), los que se unen a IgA se denominan receptores Fc-alfa (FcαR) y los que se unen a IgE se denominan receptores Fc-epsilon (FcεR). Equivalente a un ligando efector y, por tanto, incorporado en la definición es un ligando sustituto que reconoce el mismo sitio de unión o uno similar dentro del anticuerpo modular, tal como la proteína A.

Todos los FcγR pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y son los receptores Fc más importantes para inducir la fagocitosis de los microbios opsonizados (recubiertos). Esta familia incluye varios miembros; por ejemplo FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b); que difieren en sus afinidades de los anticuerpos debido a su estructura molecular diferente. Por ejemplo, FcγRI se une a IgG con más fuerza que FcγRII y FcγRII1, y tiene una porción extracelular compuesta por tres dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio más que FcγRII y FcγRIII. Estas propiedades permiten la activación de FcγRI por una única molécula de IgG (o monómero), mientras que los últimos dos receptores Fcγ deben unirse a múltiples moléculas de IgG dentro de un complejo inmunitario a activar.

Otro FcR se expresa en varios tipos celulares y tiene una estructura similar al MHC de clase I. Este receptor también se une a IgG y está implicado en la conservación de este anticuerpo. Sin embargo, dado que este receptor Fc también está implicado en la transferencia de la IgG de una madre a través de la placenta a su feto o en la leche al lactante, se denomina receptor Fc neonato (FcRn). Recientemente, este receptor se ha implicado en la participación en la

homeostasis de los niveles séricos de IgG.

La citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) es un mecanismo de inmunidad celular en el que una célula efectora del sistema inmunológico lisa de forma activa una célula diana que a la que se han unido anticuerpos específicos. Es uno de los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos, como parte de la respuesta inmunológica humoral, puede actuar para limitar y contener la infección. La ADCC clásica está mediada por las células asesinas naturales (NK); los monocitos y eosinófilos también pueden participar en la ADCC. Por ejemplo, los eosinófilos pueden matar determinados gusanos parasitarios conocidos como helmintos a través de la ADCC. La ADCC es parte de la respuesta inmunológica adaptativa debido a su dependencia de una respuesta de anticuerpos anterior.

El término "extraño" en el contexto de aminoácidos significará que los aminoácidos recién introducidos de origen natural, pero extraños del sitio de modificación, o sustitutos de los aminoácidos de origen natural.. "Extraño" con referencia a sitios de unión a antígeno significa que el sitio de unión a antígeno no está formado de forma natural mediante la región de unión específica del agente, y una pareja de unión extraña, pero no la pareja de unión natural del agente, se une al sitio de unión recién modificado por ingeniería.

La expresión "región de unión variable", en ocasiones denominada "región CDR" como se usa en el presente documento se refiere a las moléculas con estructuras variables capaces de producir interacciones de unión con antígenos. Dichas moléculas se pueden usar como tales o integrarse dentro de una proteína más grande, de modo que se forma una región específica de dicha proteína con la función de unión. Las estructuras variables pueden derivar de repertorios naturales de proteínas de unión, tales como inmunoglobulinas o filómeros o diversidad sintética, incluyendo proteínas de repeticiones, avímeros y anticalinas. Las estructuras variables también se pueden producir mediante técnicas de aleatorización, en particular las descritas en el presente documento. Estas incluyen regiones CDR o no CDR mutageneizadas, regiones bucle de dominios variables o dominios constantes de inmunoglobulinas.

Los agentes de unión modificados con diferentes modificaciones en sitios específicos se denominan "variantes". Las variantes de un armazón se agrupan, preferentemente, para formar bibliotecas de agentes de unión, que se pueden usar para seleccionar miembros de la biblioteca con funciones prefeterminadas. De acuerdo con ello, una secuencia de anticuerpos está, preferentemente, aleatorizada, por ejemplo métodos de mutagénesis. De acuerdo con una realización preferida, una región bucle de un agente de unión, tal como la secuencia de anticuerpo parental que comprende las posiciones dentro de uno o más bucles o en un sitio terminal, que contribuye potencialmente a un sitio de unión, preferentemente se muta o modifica para producir bibliotecas, preferentemente mediante métodos de mutagénesis aleatoria, semialeatoria o, en particular, aleatoria dirigida a sitio, en particular para eliminar, intercambiar o introducir insertos generados aleatoriamente en bucles o una región bucle, preferentemente en la región bucle CDR o en la región bucle estructural, que pueden incluir secuencias terminales, que se localizan en uno de los extremos de un dominio de anticuerpo o subestructura.

Como alternativa, se prefiere el uso de abordajes combinatorios. Se puede usar cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, entre ellos la mutagénesis por casete. Estos métodos se pueden usar para realizar modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En algunos casos, las posiciones se eligen de forma aleatoria, por ejemplo, con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias bucle, o se realizan cambios de aminoácidos usando normas simples. Por ejemplo, todos los residuos se pueden mutar, preferentemente, en aminoácidos específicos, tales como alanina, denominado escaneo de aminoácidos o de alanina. Dichos métodos se pueden acoplar a abordajes de ingeniería más sofisticados que usan métodos de selección para detectar niveles mayores de diversidad de secuencia.

El anticuerpo modular citotóxico de acuerdo con la invención con un peso molecular inferior a 60 kDa o hasta 60 kDa tiene un tamaño pequeño en comparación con los anticuerpos de longitud completa. El tamaño preferido es de hasta 55 kDa. Los dominios sencillos de anticuerpos modulares normalmente tienen un tamaño molecular de 10-15 kDa, por tanto, una molécula basada en, o que consiste en, 4 dominios de anticuerpos modulares tendrían un tamaño molecular de 40-60 kDa, dependiendo de la glicosilación o cualquier conjugación adicional de sustancias farmacológicamente activas, como toxinas o péptidos.

El formato preferido es un oligómero, compuesto de dominios de anticuerpos modulares, preferentemente hasta 4 dominios, más preferentemente 3 dominios, e incluso más preferentemente, basado en 2 dominios, en el que el oligómero comprende, preferentemente, un heterodímero, tal como Fab, o un homodímero, tal como Fc. Habitualmente se piensa que los formatos basados en la combinación de 5 dominios de anticuerpos modulares o más no ejercen las ventajas específicas de los fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño, que son fáciles de expresar en varios sistemas de expresión y penetración de tejidos.

Es viable proporcionar un anticuerpo modular como un anticuerpo de dominio único. Sin embargo, los dominios de anticuerpo tienden a dimerizar tras la expresión, bien como homodímero, como un Fc, o un heterodímero, como un Fab. Por tanto, la estructura dimerica se considera ventajosa para proporcionar una molécula estable. Los dímeros preferidos de los dominios de inmunoglobulinas se seleccionan del grupo que consiste en dímeros de dominio único.,

como VH/VL, CH1/CL (kappa o lambda), CH2/CH2 y CH3/CH3. Los dímeros u oligómeros de los dominios de anticuerpo modular también se pueden proporcionar como moléculas monocatenarias o bicatenarias. En particular, los que unen el extremo C de un dominio al extremo N de otro,

Las parejas de unión son agentes que se unen específicamente uno a otro, normalmente a través de las interacciones no covalentes. Ejemplos de parejas de unión incluyen parejas de agentes de unión con interacciones funcionales, tales como receptores que se unen a ligandos, anticuerpos que se unen a antígeno, un fármaco que se une a una diana, u y enzimas que se unen a un sustrato. Las parejas de unión han encontrado utilidad en muchas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas, analíticas e industriales. Las parejas de unión más prominentes son anticuerpos o inmunoglobulinas, fragmentos o derivados de los mismos. En la mayoría de los casos, se requiere que la unión de dichos agentes de unión medie en un efecto o una función biológica, una "interacción funcional".

El anticuerpo modular citotóxico puede ser un agente de unión, que es una inmunoglobulina de origen humano o murino, o se puede usar para varios fines, en particular en composiciones farmacéuticas. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada también puede ser una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

El agente de unión, que es una inmunoglobulina humana, se selecciona, o deriva, preferentemente, del grupo que consiste en IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. El agente de unión murino se selecciona, o deriva, preferentemente, del grupo que consiste en, IgA IgD, IgE, IgG 1, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3 e IgM.

Dicho agente de unión comprende, preferentemente, una cadena pesada y/o ligera o parte de las mismas. Una inmunoglobulina modificada puede comprender una cadena pesada y/o ligera, al menos un dominio variable y/o constante, o una parte del mismo que incluye un minidominio.

Un dominio constante es una unidad de pliegue de inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de inmunoglobulina, también se denomina dominio de la región constante (p. ej., CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl).

Un dominio variable es una unidad de pliegue de inmunoglobulina de la parte variable de una inmunoglobulina, también se denomina dominio de la región variable (p. ej., Vh, Vk, Vl, Vd)

Un ejemplo de anticuerpo modular puede consistir en un dominio constante seleccionado del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3, CH4, Igk-C, Igl-C, combinaciones, derivados o una parte de los mismos, incluido un minidominio, con al menos una región bucle, y se caracteriza porque dicha al menos una región bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos una región bucle modificada, en el que dicha al menos una región bucle modificada se une específicamente a al menos un epítipo de un antígeno.

Otro anticuerpo modular puede consistir en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, combinaciones, derivados o una parte de los mismos, incluido un minidominio, con al menos una región bucle, y se caracteriza porque dicha al menos una región bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos una región bucle modificada, en el que dicha al menos una región bucle modificada se une específicamente a al menos un epítipo de un antígeno.

El anticuerpo modular puede comprender uno o más dominios (p. ej., al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, diez dominios). Si en el anticuerpo modular hay presente más de un dominio, estos dominios pueden ser del mismo tipo o de varios tipos (p. ej., CH1-CH1-CH2, CH3-CH3, (CH2)₂-(CH3)₂, con o sin la región bisagra). Por supuesto, asimismo, el orden de los dominios sencillos puede ser de cualquier tipo (p. ej., CH1-CH3-CH2, CH4-CH1-CH3-CH2).

En el presente documento se divulgan partes de anticuerpos, tales como partes de IgG, IgA, IgM, IgD, IgE y similares. Los anticuerpos modulares también puede ser un fragmento de anticuerpo funcional, tal como Fab, Fab₂, scFv, Fv, Fc, FcabTM, un Fc de unión a antígeno, o partes de los mismos, u otros derivados o combinaciones de las inmunoglobulinas, tales como minicuerpos, dominios de cadenas pesadas y ligeras de la región variable (tales como dAb, Fd, VL, incluyendo Vlambda y Vkappa, VH, VHH) así como minidominios que consisten en dos hebras beta de un dominio de inmunoglobulina conectados por al menos dos bucles estructurales, como dominios aislados o en el contexto de moléculas asociadas de forma natural. En el presente documento también se divulga el fragmento Fc de una molécula de anticuerpo, bien como fragmento Fc de unión a antígeno (FcabTM) mediante modificaciones de la secuencia de aminoácidos o como conjugados o fusiones a receptores, péptidos u otros módulos de unión a antígeno, tales como scFv.

Los anticuerpos modulares se pueden usar como polipéptidos aislados o como moléculas de combinación, por ejemplo mediante técnicas de recombinación, fusión o conjugación, con otros péptidos o polipéptidos. Los péptidos son, preferentemente, homólogos a las secuencias de los dominios de inmunoglobulina, y, preferentemente, tienen una longitud de al menos 5 aminoácidos, más preferentemente, una longitud de al menos 10 o incluso al menos 50 o 100 aminoácidos, y constituyen al menos parcialmente la región bucle del dominio de inmunoglobulina. Las características de unión preferidas se refieren a la unión, afinidad y avidéz por el epítipo predefinidas.

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención se combina, posiblemente, con uno o más anticuerpos modulares

modificados o con anticuerpos modulares sin modificar, o partes de los mismos, para obtener un anticuerpo modular de combinación. Preferentemente, las combinaciones obtenidas mediante técnicas de recombinación, pero también mediante unión a través de adsorción, interacciones electrostáticas o similares, o incluso a través de la conjugación o unión química con o sin un ligador. La secuencia ligadora preferida es una secuencia ligadora natural o una secuencia artificial funcionalmente adecuada.

En general, el anticuerpo modular de acuerdo con la invención se puede usar como bloque componente para combinar molecularmente otros anticuerpos modulares o sustancias o moléculas biológicamente activas. Se prefiere combinar molecularmente al menos un anticuerpo que se une a la pareja específica mediante las secuencias variables o no variables, como bloques estructurales, con al menos otra molécula de unión que puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, un receptor soluble, un ligando u otro dominio de anticuerpo, o un resto de unión del mismo. Otras combinaciones se refieren a moléculas proteínicas, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas orgánicas e hidratos de carbono.

Las moléculas modificadas por ingeniería de acuerdo con la presente invención serán útiles como moléculas autónomas, así como proteínas o derivados de fusión, lo más normalmente fusionados antes o después de la modificación de un modo tal que forme parte de estructuras más grandes, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completo, o partes de los mismos. Por tanto, las inmunoglobulinas o proteínas de fusión también comprenden fragmentos Fc., fragmentos Fab, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena única, en particular fragmentos Fv monocatenarios, scFv bi o multiespecíficos, diacuerpos, unicuerpos, multicuerpos, multivalentes o multímeros de dominios de inmunoglobulina y otros. Será posible usar las proteínas modificadas por ingeniería para producir moléculas que son monoespecíficas, biespecíficas, triespecíficas, e incluso pueden portar más especificidades. Es posible controlar y preseleccionar la valencia de unión al mismo tiempo de acuerdo con los requisitos del uso planificado de dichas moléculas.

El anticuerpo modular ejerce opcionalmente una o más regiones de unión a antígenos, incluyendo el sitio de unión que se une específicamente a la diana de la superficie celular y los sitios de unión que participan en la función efectora. Los sitios de unión a antígeno a uno o más antígenos pueden estar presentados por la región CDR o cualquier otra estructura de unión al receptor natural, o introducir en una región bucle estructural de un dominio de anticuerpo, de una estructura de dominio variable o constante. Los antígenos como se usan para analizar las propiedades de unión de los sitios de unión pueden ser moléculas de origen natural o moléculas sintetizadas químicamente o moléculas recombinantes, bien en solución o en suspensión, por ejemplo localizados sobre o en partículas tales como fases sólidas, sobre o en las células o sobre las superficies virales. Se prefiere que la unión de una inmunoglobulina a un antígeno se determina cuando el antígeno todavía está adherido o unido a moléculas y estructuras en el contexto natural. De este modo, es posible identificar y obtener las inmunoglobulinas modificadas que son más adecuadas para el fin del uso diagnóstico o terapéutico.

El anticuerpo modular o los dominios de inmunoglobulina pueden modificarse (como se usa en el presente documento, los términos inmunoglobulina y anticuerpo son intercambiables), modificaciones que preferentemente se efectúan en dominios de inmunoglobulina o partes de los mismos que están en secuencias terminales, preferentemente una secuencia C-terminal, y/o parte de una región bucle, que contiene un bucle, bien un bucle CDR o un bucle no CDR, siendo los bucles estructurales, los sitios preferidos de modificaciones o mutagénesis. De acuerdo con una realización específica, la región bucle estructural también incluye una secuencia terminal, que contribuye a la unión a antígeno. En algunos casos, es preferible usar un bucle estructural modificado definido o una región bucle estructural, o partes de los mismos, como moléculas aisladas para fines de unión o combinación.

El anticuerpo modular puede unirse a dicha diana de la superficie celular mediante al menos parte de un bucle estructural y/o un bucle CDR.

Como alternativa, el anticuerpo modular puede unirse a dicho ligando efector, o un ligando sustituto para dicho ligando efector, como la proteína A, a través de al menos parte de un bucle estructural y/o bucle CDR, de modo que media en la función efectora.

En una realización preferida, el agente de unión se une a su estructura de unión nativa o modificada o sitio de unión recién formado, específicamente a al menos dos de estos epítomos que son idénticos o difieren entre sí, bien del mismo antígeno o de diferentes antígenos.

En una estructura de dominio preferida de un agente de unión, se prefiere modificar o aleatorizar el anticuerpo modular dentro de al menos una región bucle o región terminal, que tiene como resultado una sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos o aminoácidos, preferentemente una mutación puntual, o incluso el intercambio de bucles enteros, más preferentemente el cambio de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, hasta 30 aminoácidos: De este modo, la secuencia modificada comprende aminoácidos no incluidos en las regiones conservadas de los bucles, siendo los aminoácidos recién introducidos de origen natural, pero extraños del sitio de modificación, o sustitutos de los aminoácidos de origen natural.

Sin embargo, el número máximo de aminoácidos insertados en una región bucle de un agente de unión puede,

preferentemente, no superar el número 30, preferentemente 25, más preferentemente 20 aminoácidos como máximo. La sustitución y la inserción de los aminoácidos se produce, preferentemente, de forma aleatoria o semialeatoria usando todos los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para fines de aleatorización, mediante métodos conocidos en la técnica y como se divulgan en la presente solicitud de patente.

El sitio de modificación puede estar en un bucle único específico o una región bucle, en particular, un bucle estructural o una región bucle estructural. Una región bucle normalmente está compuesta por al menos dos, preferentemente al menos 3 o al menos 4 bucles que son adyacentes entre sí, y que pueden contribuir a la unión de un antígeno a través de la formación de un sitio de unión a antígeno o cavidad de unión a antígeno. Se prefiere que uno o más sitios de modificación se localicen dentro del área de 10 aminoácidos, más preferentemente en 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100 aminoácidos, en particular dentro de una región estructural para formar una superficie o cavidad en la que el antígeno puede acceder estéricamente a las regiones bucle.

A este respecto, las modificaciones preferidas se someten a ingeniería en las regiones bucle de CH1, CH2, CH3 y CH4, en particular en el intervalo de los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117, o dentro de las secuencias terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominio de anticuerpo modular.

En otra realización preferida, una modificación en la región bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 se combina con una modificación en la región bucle estructural que comprende los aminoácidos 8 a 20.

Las regiones de los aminoácidos identificados anteriormente de las respectivas inmunoglobulinas comprenden regiones bucle a modificar. Preferentemente, una modificación en la región bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 se combina con una modificación en uno o más de los otros bucles estructurales.

En otra realización preferida, una modificación en la región bucle estructural que comprende los aminoácidos 92 a 98 se combina con una modificación en la región bucle estructural que comprende los aminoácidos 41 a 45,2.

Lo más preferentemente, cada uno de los bucles que comprende los aminoácidos 92 a 98, los aminoácidos 41 a 45,2 y los aminoácidos 8 a 20 contienen al menos una modificación de aminoácido.

En otra realización preferida, cada uno de los bucles estructurales que comprende los aminoácidos 92 a 98, los aminoácidos 41 a 45,2, y los aminoácidos 8 a 20 contienen al menos una modificación de aminoácido.

De acuerdo con otra realización preferida, los residuos de aminoácidos en el área de las posiciones 15 a 17, 29 a 34, 41 a 45,2, 84 a 85, 92 a 100, y/o de 108 a 115 de CH3 están modificados.

Las modificaciones preferidas de Igk-C and Igl-C de origen humano se modifican por ingeniería en las regiones bucle en el área de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 26 a 36, los aminoácidos 41 a 82, los aminoácidos 83 a 88, los aminoácidos 92 a 100, los aminoácidos 107 a 124 y los aminoácidos 123 a 126, o dentro de las secuencias terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominio de anticuerpo modular.

Las modificaciones preferidas de las regiones bucle de Igk-C e Igl-C de origen murino se modifican por ingeniería en los sitios en el área de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 26 a 36, los aminoácidos 43 a 79, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 90 a 101, los aminoácidos 108 a 116 y los aminoácidos 122 a 126,

Otra inmunoglobulina que se puede usar como agente terapéutico consiste en un dominio variable de una cadena pesada o ligera, o una parte del mismo que incluye un minidominio. con al menos una región bucle, preferentemente una región bucle estructural, y se caracteriza porque dicha al menos una región bucle comprende al menos una modificación de aminoácidos que forma al menos una región bucle modificada, en el que dicho al menos una región bucle modificada forma un sitio de unión relevante como se ha descrito en lo que antecede.

De acuerdo con una realización específica, la inmunoglobulina puede contener una modificación dentro del dominio variable, que se selecciona del grupo de VH, Vkappa, Vlambda, VHH y combinaciones de los mismos. Más específicamente, comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 22, los aminoácidos 39 a 55, los aminoácidos 66 a 79, los aminoácidos 77 a 89 y los aminoácidos 89 a 104, en los que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT o dentro de las secuencias terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominio de anticuerpo modular.

La inmunoglobulina se puede caracterizar por que las regiones bucle de VH o Vkappa o Vlambda de origen humano comprenden al menos una modificación dentro de los aminoácidos 7 a 22, los aminoácidos 43 a 51, los aminoácidos 67 a 77, los aminoácidos 77 a 88, y los aminoácidos 89 a 104, lo más preferentemente las posiciones de aminoácidos 12 a 17, las posiciones de aminoácidos 45 a 50, las posiciones de aminoácidos 68 a 77, los aminoácidos 79 a 88, y las posiciones de aminoácidos 92 a 99, en los que la numeración de la posición de los aminoácidos de los dominios es la del IMGT.

Las regiones bucles estructurales. del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano, como posibles

seleccionadas para fines de modificación se localizan, preferentemente, en el área de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, los aminoácidos 78 a 87, y los aminoácidos 89 a 101, o dentro de las secuencia terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominios de anticuerpo modular.

De acuerdo con una realización preferida, las regiones bucle estructurales del dominio variable de la inmunoglobulina de origen murino como posibles seleccionadas para fines de modificación se localizan, preferentemente, en el área de los aminoácidos 6 a 20, los aminoácidos 43 a 52, los aminoácidos 67 a 79, los aminoácidos 79 a 87, y los aminoácidos 91 a 100, o dentro de las secuencia terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominios de anticuerpo modular.

La inmunoglobulina usada como agente terapéutico también pueden ser de origen camélido. Los anticuerpos de camélidos comprenden únicamente una cadena pesada y tienen la misma afinidad por antígeno que los anticuerpos normales, que consisten en las cadenas ligeras y pesadas. En consecuencia, los anticuerpos de camélidos son mucho más pequeños que, (p. ej., anticuerpos humanos, que les permite penetrar en los tejidos densos para alcanzar el antígeno, donde las proteínas más grandes no pueden. Además, la simplicidad comparativa, la elevada afinidad y especificidad y el potencial para alcanzar e interactuar con los sitios activos, los anticuerpos de cadena pesada de camélidos presentan ventajas sobre los anticuerpos habituales en el diseño, producción y aplicación de los compuestos clínicamente valiosos.

Las regiones bucles estructurales de un anticuerpo modular o una inmunoglobulina de origen camélido se pueden modificar, por ejemplo en una VHH en la región de los aminoácidos 7 a 19, los aminoácidos 43 a 55, los aminoácidos 68 a 76, los aminoácidos 80 a 87 y los aminoácidos 91 a 101, o dentro de las secuencia terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominios de anticuerpo modular.

El método preferido de producir un anticuerpo modular se refiere a la modificación por ingeniería de un anticuerpo modular que se une específicamente a al menos un primer epítipo, que comprende modificaciones en cada uno de al menos dos sitios o bucles dentro de una región bucle estructural, y determinar la unión específica de dicha región bucle estructural a al menos un segundo epítipo, en el que la región bucle estructural sin modificar (región no CDR) no se une específicamente a dicho al menos un segundo epítipo. Por tanto, un anticuerpo o estructura de unión a antígeno para un primer antígeno se puede mejorar añadiendo otra valencia o especificidad contra un segundo antígeno, en la que la especificidad puede ser idéntica, ya sea frente a diferentes epítopos o frente al mismo epítipo, para aumentar la valencia o para obtener moléculas bi, oligo o multiespecíficas.

Por otro lado, se prefiere hacer uso de los anticuerpos modulares que contienen estructuras nativas que interactúan con moléculas efectoras o células inmunitarias, preferentemente para unirse a un ligando efector. Dichas estructuras nativas permanecen sin modificar o se modulan para una función efectora incrementada. Se ha descrito que los sitios de unión para, por ejemplo, receptores Fc, se localizan en una región de dominio CH2 y/o H3 y pueden mutageneizarse mediante técnicas bien conocidas-

La ADCC, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, es la muerte de las células diana recubiertas por anticuerpos por las células con receptores Fc que reconocen la región constante del anticuerpo unido. La mayoría de la ADCC está mediada por las células NK que tienen el receptor FcγRIII o CD16 sobre su superficie. Los ensayos típicos usan células diana como células de Ramo, se incuban con anticuerpos diluidos en serie antes de la adición de células efectoras recién aisladas. El ensayo ADCC se incuba después durante varias horas y se detecta el % de citotoxicidad. Normalmente, la diana: proporción de efectoras es de aproximadamente 1:16 pero puede ser de 1:1 a 1:50

La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es un mecanismo de matar células, en el que el anticuerpo unido a la superficie de la célula diana fija el complemento, lo que tiene como resultado un ensamblaje del complejo de ataca a la membrana que perfora orificios en la membrana de la célula diana resultante en la lisis celular posterior. El ensayo CDC de uso habitual sigue el mismo procedimiento que para la determinación de ADCC, sin embargo, conteniendo el complemento suero en lugar de células efectoras.

La actividad citotóxica determinada mediante ADCC y CDC se ha probado para un anticuerpo modular de acuerdo con la invención, si existe un incremento significativo en el porcentaje de la citólisis en comparación con un control. La actividad citotóxica relacionada con la ADCC o CDC se mide, preferentemente, como el incremento del porcentaje absoluto, que es, preferentemente, superior al 5 %, más preferentemente, superior al 10 %, incluso más preferentemente superior al 20 %.

La fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, ADCP, en ocasiones denominada ADPC, normalmente se investiga junto con la citólisis de células humanas cultivadas. La fagocitosis por los fagocitos, normalmente monocitos humanos o macrófagos derivados de monocitos, mediada por un anticuerpo, se puede determinar del siguiente modo. Los monocitos purificados se pueden cultivar con citocinas para potenciar la expresión de los FcγR o para inducir la diferenciación en macrófagos. Los ensayos de ADCP y ADCC se realizan después con las células diana. La fagocitosis se determina como el porcentaje de células positivas medidas mediante citometría de flujo. La actividad de

ADCP positiva se demuestra con una captación significativa del complejo anticuerpo-antígeno mediante los fagocitos. La actividad citotóxica relacionada con la ADCP se mide, preferentemente, como el porcentaje absoluto de la captación del complejo antígeno-anticuerpo mediante los fagocitos, que es, preferentemente, superior al 5 %, más preferentemente, superior al 10 %, incluso más preferentemente superior al 20 %.

En un ensayo típico, los PBMC o monocitos o macrófagos derivados de monocitos se suspenden en medio RF2 (RPMI 1640 suplementado con 2 % de FCS) en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^5 células viables en 100 ml/pocillo. Las células diana adecuadas, que expresan el antígeno diana, por ejemplo antígeno Her2/neu y células SKBR3, se tiñen con colorante fluorescente verde PKH2. Después, 1×10^4 células diana marcadas con PKH2 y un anticuerpo (IgG1) específico de Her2 (o anticuerpo modular) o isotipo de IgG1 de ratón como control (o anticuerpo modular control) se añaden al pocillo de los PBMC a concentraciones diferentes (p. ej., 1-100 mg/ml) y se incuban en un volumen final de 200 µl a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, los PBMC o monocitos o macrófagos derivados de monocitos y las células diana se recogen con EDTA-PBS y se transfieren a placas de 96 pocillos de fondo en V. Las placas se centrifugan y se aspira el sobrenadante. Las células se someten a contratinción con una mezcla de 100 µl de anti-CD11b, anti-CD14, e IgG humana conjugados con RPE, se mezclan y se incuban durante 60 minutos en hielo. Las células se lavan y se fijan con 2 % de formaldehído-PBS. Se realiza un análisis citométrico de flujo con dos colores con, por ejemplo, con FACS Calibur en acotamiento óptimo. Las células diana marcadas con PKH2 (verde) se detectan en el canal FL-1 (longitud de onda de emisión, 530 nm) y PBMC o monocitos marcados con RPE o macrófagos derivados de monocitos (rojo) se detectan en el canal FL-2 (longitud de onda de emisión, 575 nm). Las células diana residuales se definen como células que son células marcadas con PKH2+/RPE⁻ Dual (PKH2+/RPE⁻) que se considera que representan la fagocitosis de las dianas por las PBMC o los monocitos o macrófagos derivados de monocitos. La fagocitosis de las células diana se calcula con la ecuación siguiente: porcentaje de fagocitosis = $100 \times [(\text{porcentaje de dobles positivas})/(\text{porcentaje de dobles positivas} + \text{porcentaje de dianas residuales})]$. Todas las pruebas normalmente se realizan por duplicado o por triplicado y los resultados se expresan como la media $\pm$ 6 SD.

La actividad apoptótica se mide, preferentemente, usando métodos estándar de determinación de las células moribundas o muertas. Con el fin de medir la necrosis y la apoptosis, se pueden usar ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos pueden ser ensayos radioactivos y no radioactivos que miden incrementos en la permeabilidad de la membrana plasmática, ya que las células moribundas presentan fugas o los ensayos colorimétricos que miden la reducción de la actividad metabólica de las mitocondrias; las mitocondrias en las células muertas no pueden metabolizar los colorantes, mientras que las mitocondrias de las células vivas sí pueden.

También se pueden medir indicadores tempranos de la apoptosis, tal como la fragmentación del ADN en poblaciones de células o en células individuales, en los que el ADN apoptótico se rompe en piezas de diferente longitud, las alteraciones en la asimetría de la membrana (ensayos basados en fosfatidil serina y anexina V), medición de la activación de las caspasas apoptóticas o medición de la liberación del citocromo C y AIF en el citoplasma por las mitocondrias.

La actividad citotóxica preferida del anticuerpo modular de acuerdo con la invención constituye al menos el 20 % de la citolisis, medida en un respectivo ensayo de lisis celular ex vivo.

Preferentemente, la actividad citotóxica del anticuerpo modular de acuerdo con la invención es mediar en la lisis celular o en la muerte celular en un ensayo basado en células con una $CE_{50} < 10^{-8}$ M, preferentemente en el intervalo nanomolar o inferior.

La función efectora del anticuerpo modular de acuerdo con la invención es preferentemente, una actividad citotóxica biológica, que normalmente difiere de cualquier actividad citotóxica sintética, por ejemplo, como se proporciona mediante una toxina que puede estar conjugada a una estructura de inmunoglobulina. Las toxinas normalmente no activan las moléculas efectoras y el mecanismo de defensa biológica. Por tanto, la actividad citotóxica de los anticuerpos modulares de acuerdo con la invención es, una actividad citotóxica biológica, que normalmente es inmunoestimulante, lo que conduce a una citolisis eficaz.

La actividad citotóxica se diferencia además del simple efecto de inhibición celular en que una sustancia está inhibiendo el crecimiento celular, por ejemplo uniéndose al receptor de un factor de crecimiento, de modo que se bloquea la función del factor de crecimiento, o inhibiendo la angiogénesis. La citotoxicidad se considera esencialmente como un ataque activo para matar células, lo que conduce a la muerte o lisis celular, y, por tanto, se considera una forma altamente eficiente para reducir inmediatamente el número de células malignas o infectadas. En comparación con los compuestos citotóxicos, los inhibidores del crecimiento celular no matan las células inmediatamente, sino que únicamente reducen el crecimiento y la proliferación celular, por lo que se consideran menos activos para fines terapéuticos.

El anticuerpo modular puede unirse específicamente a cualquier tipo de moléculas o estructuras de unión. en particular a antígenos, moléculas proteínicas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, hidratos de carbono, lípidos, moléculas orgánicas, en particular moléculas orgánicas pequeñas, moléculas anorgánicas, o combinaciones o fusiones de los mismos, incluyendo PEG, profármacos o fármacos. El anticuerpo modular puede comprender al menos dos bucles o regiones bucle en las que cada uno de los bucles o regiones bucle pueden unirse

específicamente a diferentes moléculas o epítomos.

Preferentemente, el antígeno diana se selecciona de antígenos de superficie celular, incluyendo receptores, en particular del grupo que consiste en las tirosinas quinasas receptoras de erbB (tales como EGFR, HER2, HER3 y HER4, en particular los epítomos de los dominios extracelulares de dichos receptores, p. ej., el epítomo 4D5), moléculas de la superfamilia del receptor del TNF, tal como el receptor de Apo-1, TNFR1, TNFR2, el receptor del factor de crecimiento neural NGFR, CD40, moléculas de la superficie de los linfocitos T, receptores de linfocitos T, antígeno OX40 de los linfocitos T, receptor TACI, BCMA, Apo-3, DR4, DR5, DR6, receptores señuelo, tales como DcR1, DcR2, CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, pero no se limitan a estas moléculas, antígenos de la superficie de los linfocitos B, tales como CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, antígenos o marcadores de tumores sólidos o células cancerosas hematológicas, células de linfoma o leucemia, otras células sanguíneas, incluyendo plaquetas, pero no se limitan a estas moléculas.

De acuerdo con una realización preferida adicional, el antígeno diana se selecciona de los antígenos presentados por las células, como células epiteliales, células de tumores sólidos, células infectadas células sanguíneas, células presentadoras de antígeno y células mononucleares. Dichos antígenos diana expresados y sobreexpresados por las células están, preferentemente, dirigidos, que se seleccionan del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, en particular EpCAM, glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), antígeno asociados a tumores CA 125, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno asociado con el melanoma de peso molecular alto (HMW-MAA), antígeno asociado a tumores que expresa hidratos de carbono relacionados con cuerpos de Lewy, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, MUC1 de mucina, MUC18 y antígeno asociado con tumores de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, moléculas de IgE relacionadas con la alergia. cKIT y receptor de Fc-epsilon, IRp60, receptor de IL-5, CCR3, receptor de glóbulos rojos (CR1), seroalbúmina humana, seroalbúmina de ratón, seroalbúmina de rata, receptores Fc., receptor FcRn-Fc gamma neonatal, receptores Fc-gamma-- Fc-gamma RI, Fc-gamma-RII, Fc-gamma RIII, receptores Fc-alfa, receptores Fc-epsilon, fluoresceína, lisozima, receptor 9 de tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, LIF, OSM, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, TNF alfa, TNFbeta2, TNF alfa, TNF alfa beta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1 BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor 1 de TRAIL, receptor A1 de adenosina, receptor beta de linfotoxinas, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta1, integrina alfa-4/beta 7, integrina alfa 2, integrina alfa 3, integrina alfa 4, integrina alfa 5, integrina alfa 6, integrina alfa v, integrina alfa V beta 3, FGFR-3, Factor de crecimiento de queratinocitos, GM-CSF, M-CSF, RANKL, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de linfocitos T B7-1, B7-2, integrina VNR, TGF beta 1, TGF beta 2, eotaxina 1, BLyS (estimulador de los linfocitos B), complemento C5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, factor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de la endotelina, VLA-4, hidratos de carbono. tales como los antígenos del grupo sanguíneo e hidratos de carbono. relacionados. Galili- Glicosilación, Gastrina, receptores de la gastrina, hidratos de carbono asociados con tumores, protección NP o protección NIP de hapteno, receptor alfa/beta de linfocitos T, E-selectina, P-glicoproteína, MRP3, MRP5, glutatión-S-transferasa o (proteínas de resistencia a múltiples fármacos), proteína de la membrana de gránulos alfa (GMP), 140 digoxina, fosfatasa alcalina de la placenta (PLAP) y fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, receptor de la transferrina, Heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína 11 b/111 a (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta de gH del citomegalovirus humano (HCMV), gp120 del VIH, HCMV, virus sincitial respiratorio, RSVF, Fgp del RSVF, integrina VNR, gp120 de Hep B, CMV, gpIIbIIIa, bucle V3 de gp120 de HIV IIIB, Fgp del virus sincitial respiratorio (RSV), glicoproteína gD del virus del herpes simple (VHS) glicoproteína gB del VHS, glicoproteína de la cubierta gB del HCMV, toxina de Clostridium perfringens y fragmentos de la misma.

Los anticuerpos modulares se pueden unir a dicho antígeno diana con una afinidad elevada, en particular con una constante de asociación alta y/o disociación baja, o una avidéz alta por la unión. Normalmente, se considera que un ligante tiene una afinidad elevada con una $K_d < 10^{-9}$ M. Se pueden preparar ligantes de afinidad media con una K_d inferior a 10^{-6} hasta 10^{-9} , preferentemente junto con un proceso de maduración de la afinidad.

La maduración de la afinidad es el proceso por el cual se producen anticuerpos con una mayor afinidad por el antígeno. Con cambios estructurales de un anticuerpo, incluyendo mutagénesis de aminoácidos o como consecuencia de la mutación somática en los segmentos génicos de la inmunoglobulina, se producen variantes de un sitio de unión a un antígeno y se seleccionan las afinidades mayores. Los anticuerpos modulares de afinidad madurada pueden exhibir una afinidad mayor que un anticuerpo parental. Los anticuerpos parentales únicos se pueden someter a maduración de la afinidad. Como alternativa, conjuntos de anticuerpos modulares con una afinidad de unión similar al antígeno diana se pueden considerar estructuras parentales que varían para obtener anticuerpos únicos de afinidad madurada o conjuntos de dichos anticuerpos con afinidad madurada.

La variante de afinidad madurada preferida de un anticuerpo modular exhibe al menos un incremento por 10 en la afinidad de la unión, preferentemente un incremento de al menos 100 veces. La maduración de la afinidad se puede usar en el curso de las campañas de selección que usan las respectivas bibliotecas de moléculas parentales, bien con anticuerpos modulares con una afinidad de unión media para obtener el anticuerpo modular de la invención que tiene

la propiedad de unión a la diana específica de una afinidad de unión $K_d < 10^{-8}$ M y, opcionalmente, una potencia de $CI_{50} < 10^{-8}$ M. Como alternativa, la potencia de unión o afinidad se puede aumentar todavía más mediante la maduración de la afinidad del anticuerpo modular de acuerdo con la invención para obtener los elevados valores correspondientes a una K_d o CI_{50} inferior a 10^{-9} M, preferentemente inferior a 10^{-10} M o incluso inferior a 10^{-11} M, lo más preferido, en el intervalo picomolar,

La CI_{50} , también denominada CE_{50} o concentración de saturación al 50 %, es una medida de la potencia de unión de un anticuerpo modular. Es la concentración molar de un ligante, que produce el 50 % de la unión máxima posible en el equilibrio en en saturación. La potencia de un ligante suele estar definida por su CI_{50} (en el presente documento se entiende como un valor de CE_{50}). Esto se puede calcular para un ligante dado determinando la concentración de ligante necesaria para provocar la mitad de la saturación de la unión máxima. Determinar un valor de CI_{50} o CE_{50} es útil para comparar la potencia de los anticuerpos o variantes de anticuerpos con eficacias similares,, en particular, cuando se determina en ensayos de unión de saturación, no en ensayos competitivos. En este caso, se considera como la concentración que determina la concentración en plasma para obtener un efecto semimáximo (50 %) in vivo. Cuando menor es la CI_{50} o la CE_{50} mayor es la potencia del anticuerpo modular, y cuando menor es la concentración del anticuerpo necesaria para inhibir la respuesta biológica máxima igual es la función efectora o la actividad citotóxica, Las concentraciones más bajas de anticuerpos también se pueden asociar con menores efectos secundarios.

La afinidad de unión de un anticuerpo normalmente se caracteriza en términos de la concentración del anticuerpo a la cual están ocupados la mitad de los sitios de unión a antígeno, conocida como la constante de disociación (K_d , o K_d).

Normalmente, la afinidad de un anticuerpo se correlaciona bien con la CI_{50} , cuando se determina en un ensayo de unión de saturación. La afinidad de un antagonista por su sitio de unión (K_i) se entiende como su capacidad para unirse a un receptor, que determina la duración de la unión y la respectiva actividad agonista. Las medidas para aumentar la afinidad mediante maduración de la afinidad normalmente también aumenta la potencia de la unión, lo que tiene como resultado la correspondiente reducción de los valores de CI_{50} en el mismo intervalo de los valores de K_d .

Los valores de CI_{50} y K_d se pueden determinar usando los ensayos de unión de saturación bien conocidos en la técnica. Al contrario que los ensayos de competición, los ensayos de unión de saturación proporcionan un valor independiente de la concentración de un competidor, por tanto, un valor comparable que puede ser indicativo de la afinidad de unión in vivo.

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención se conjuga, preferentemente, con una molécula marcadora o indicadora, seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Se pueden usar inmunoglobulinas modificadas con moléculas marcadoras o indicadoras, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos diagnósticos.

El anticuerpo modular de acuerdo con la invención se puede conjugar con otras moléculas que permiten la simple detección de dicho conjugado en, por ejemplo, ensayos de unión (p. ej., ELISA) y estudios de unión.

En una realización preferida, las variantes de anticuerpo se someten a detección selectiva usando uno o más ensayos basados en células o in vivo. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas modificadas purificadas o sin purificar normalmente se añaden exógenamente de un modo tal que las células se exponen a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos normalmente se basan, aunque no siempre, en la función de la inmunoglobulina, es decir, la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana y participar en algún acontecimientos bioquímico, por ejemplo, función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis, y similares. Dichos ensayos a menudo implican monitorización de la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo la supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional, tal como expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de anticuerpos para producir ADCC, ADCP, CDC o actividad apoptótica. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, es decir además de las células diana, por ejemplo, complemento sérico, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, y similares. Dichas células adicionales pueden proceder de cualquier organismo, preferentemente seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los anticuerpos modulares pueden producir apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan la diana o pueden mediar en el ataque sobre las células diana por células inmunitarias que se han añadido al ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte celular o la viabilidad celular son conocidos en la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radioactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción de la caspasa pueden permitir medir la apoptosis y la captación o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes, tales como azul alamar, pueden permitir la monitorización del crecimiento activación celular.

En una realización preferida, se puede usar el ensayo de citotoxicidad basado en DELFIART EuTDA (Perkin Elmer, MA). Como alternativa, las células muertas o dañadas se pueden monitorizar midiendo la liberación de uno o más componentes intracelulares naturales, por ejemplo lactato deshidrogenasa.

La activación de la transcripción también puede servir como método para analizar la función en ensayos basados en

células. En este caso, la respuesta se puede monitorizar analizando los genes naturales o inmunoglobulinas que pueden regularse por aumento, por ejemplo, se puede medir la liberación de determinadas interleucinas. o, como alternativa, la lectura se puede realizar a través de una construcción indicadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medida de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de anticuerpos modulares. Tipos de células para dichos ensayos pueden ser células procariotas o eucariotas, y se pueden usar diversas líneas celulares conocidas en la técnica. Como alternativa, la detección selectiva basada en células se realiza usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, las variantes de anticuerpos no se añaden exógenamente a las células. Por ejemplo, en una realización, la detección selectiva basada en células usa expresión en superficie celular. Se puede usar una pareja de fusión que permita expresar inmunoglobulinas modificadas sobre la superficie celular (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).

En una realización preferida, la inmunogeneidad de los anticuerpos modulares se puede determinar experimentalmente usando uno o más ensayos basados en células. En una realización preferida, se usan ensayos de activación ex vivo de linfocitos T para cuantificar experimentalmente la inmunogeneidad. En este método, las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T nativos de donantes equivalentes se exponen a un péptido o a un anticuerpo entero de interés una o más veces. Después, la activación de los linfocitos T se puede detectar usando una serie de métodos, por ejemplo mediante monitorización de la producción de citocinas o midiendo la captación de timidina tritiada. En la realización más preferida, la producción de interferón gamma se monitoriza usando ensayos ELISPOT.

Las propiedades biológicas del anticuerpo modular de acuerdo con la invención se pueden caracterizar in vivo en experimentos con tejido celular y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se analizan in vivo en animales, incluyendo, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética de un fármaco, la farmacodinamia, la toxicidad, y otras propiedades. Se puede hacer referencia a los animales como modelos de enfermedad. A menudo, los agentes terapéuticos se prueban en ratones, incluyendo, entre otros, ratones atímicos, ratones SCID, ratones con xenoinjertos, y ratones transgénicos (incluyendo activados e inactivados). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo a usar como agente terapéutico con la semivida adecuada, función efectora, actividad apoptótica, actividad citotóxica o citolítica adecuadas. Cualquier organismo, preferentemente mamíferos, se puede usar para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los primates, monos, pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por tanto, se pueden usar para probar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética, la farmacodinamia, la semivida, u otra propiedad del anticuerpo modular de acuerdo con la invención. Las pruebas de las sustancias en seres humanos son necesarias, en última instancia, para la aprobación de los fármacos y, por tanto, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Por consiguiente, los anticuerpos modulares de la presente invención se pueden analizar en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, Inmunogenicidad, farmacocinética, y/u otras propiedades clínicas. Especialmente, los anticuerpos modulares que se unen a células únicas o a un complejo celular a través de al menos dos motivos de unión, preferentemente la unión de al menos tres estructuras con reticulación con las células diana, se considerarían eficaces en la actividad efectora o la actividad preapoptótica o apoptótica tras la reticulación y dirección celular. La unión multivalente proporciona una asociación relativamente grande de las parejas de unión, también denominado reticulación, que es un requisito previo para la apoptosis y la muerte celular.

El anticuerpo modular de la presente invención puede encontrar uso en una amplia gama de productos de anticuerpos. En una realización, el anticuerpo modular de la presente invención se usa para terapia o profilaxis, por ejemplo como inmunoterapia activa o pasiva, para uso preparativo, industrial o analítico, como compuesto diagnóstico, industrial o reactivo de investigación, preferentemente un agente terapéutico. El anticuerpo modular puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para capturar o matar células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una realización alternativa, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo, antagonizando una citocina o receptor de citocinas.

En una realización preferida alternativa, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar los factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y, de este modo, mediar en la muerte de las células diana portadoras o que necesitan el antígeno diana.

En una realización preferida alternativa, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar enzimas y sustratos de enzimas.

En una realización preferida, un anticuerpo modular se administra a un paciente para tratar un trastorno específico. Un "paciente", para los fines de la presente invención, incluye seres humanos y otros animales, preferentemente mamíferos y, lo más preferentemente, seres humanos. Por "trastorno específico" se quiere decir, en el presente documento, un trastorno que se puede mejorar mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

En una realización, un anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente

activo administrado a un paciente. Como alternativa, el anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos, incluyendo, entre otros, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de la quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. El anticuerpo modular se puede administrar de forma concomitante con uno o más de otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo modular de la presente invención se puede administrar al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o ambos, quimioterapia o terapia de radiación. En una realización, el anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más anticuerpos, que pueden o no comprender un anticuerpo modular de la presente invención. De acuerdo con otra forma de realización de la invención, el anticuerpo modular de la presente invención y una o más terapias anticancerosas se usan para tratar las células cancerosas ex vivo. Se contempla que dicho tratamiento ex vivo puede ser útil en el trasplante de médula ósea y, en particular, trasplante autólogo de médula ósea. Por supuesto, se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan usar en combinación con otras técnicas terapéuticas más, tales como cirugía.

Otros diversos agentes terapéuticos pueden encontrar uso para la administración con el anticuerpo modular de la presente invención. En una realización, el anticuerpo modular se administra con un agente antiangiogénico, que es un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, una molécula de fusión Fc, o citocina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en la estimulación de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En realizaciones alternativas, el anticuerpo modular se administra con un agente terapéutico que induce o potencia la respuesta inmunológica adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a CTLA-4. En una realización alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de la tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, el anticuerpo modular de la presente invención se administra con una citocina. Por "citocina", como se usa en el presente documento, se quiere decir un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo quimiocinas.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que los anticuerpos modulares de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos se formulan. Las formulaciones estables de los anticuerpos modulares de la presente invención se preparan para almacenar mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado deseado de pureza con vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales, excipientes o estabilizantes, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se van a usar para la administración in vivo son, preferentemente, estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. El anticuerpo modular y otros agentes terapéuticamente activos divulgados en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas y/o atrapados en microcápsulas.

La administración de la composición farmacéutica que comprenden un anticuerpo modular de la presente invención, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse de varios modos, incluyendo, entre otras, las vías oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, mucosa, tópica (p. ej., geles, salvas, lociones, cremas, etc.), Intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (p. ej., tecnología de inhalación AERx™ disponible en el mercado en Aradigm, o sistema de liberación pulmonar Inhance™ disponible en el mercado en Inhale Therapeutics), vaginal, parenteral, rectal, o intraocular.

Los anticuerpos modulares se pueden modificar mediante un método de mutagénesis para obtener un nuevo sitio de unión. La mutagénesis preferida se refiere a técnicas de aleatorización, en las que la secuencia de aminoácidos de un péptido o polipéptido está mutada al menos en una posición, por tanto, se obtiene una secuencia aleatorizada, que participa en la unión a antígeno. Por ejemplo, las secuencias de anticuerpo específicas se modifican de forma aleatoria para obtener una molécula de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina, dominios de inmunoglobulina o parte del mismo, que comprende al menos una unidad de repetición de nucleótidos, preferentemente dentro de una región de codificación de bucle estructural o dentro de una región terminal, que tiene la secuencia 5'-NNS-3', 5'-NNN-3', 5'-NNB-3' o 5'-NNK-3'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico modificado comprende codones seleccionados del grupo de TMT, WMT, BMT, RMC, RMG, MRT, SRC, KMT, RST, YMT, MKC, RSA, RRC, NNK, NNN, NNS o cualquier combinación de los mismos (la codificación es conforme a la IUPAC).

La modificación de la molécula de ácido nucleico puede realizarse introduciendo oligonucleótidos sintéticos en un segmento más grande de ácido nucleico o mediante la síntesis de novo de una molécula de ácido nucleico completa. La síntesis de ácido nucleico se puede realizar con bloques componentes de tres nucleótidos que reducirían el número de combinaciones de secuencias sin sentido si se va a codificar un subconjunto de aminoácidos (p. ej., Yanez et al. Nucleic Acids Res. (2004) 32:e158; Virmekas et al. Nucleic Acids Res. (1994) 22:5600-5607).

Cada potencial dominio de unión puede permanecer físicamente asociado a la molécula de ADN o de ARN completa que lo codifica, y, además, las proteínas de fusión oligomerizan en la superficie de un paquete genético. para presentar el polipéptido de unión en la estructura oligomérica nativa y funcional. Una vez que se han identificado dominios de unión satisfactorios, se puede obtener fácilmente el gen para expresión, recombinación o fines de ingeniería adicionales. La forma que toma dicha asociación es un "paquete genético replicable", tal como un virus, célula o

espora que se replica y expresa el gen que codifica el dominio de unión, y transporta el dominio de unión a su superficie externa. Otra forma es un paquete genético, replicable in vitro, tal como ribosomas que unen el ARN de codificación con la proteína traducida. En la expresión en ribosomas, el material genético se replica mediante amplificación enzimática con polimerasas.

5 Dichas células o virus de ácido nucleico portador de los agentes de unión que reconocen la molécula diana están aisladas y, en caso necesario, amplificadas. El paquete genético, es, preferentemente, en fago M14, y la proteína incluye la señal de transporte a la superficie externa de la proteína génica III del M13.

10 El sistema de expresión preferido para las proteínas de fusión es una célula huésped no supresora, que sería sensible a un codón de terminación, tal como un codón de terminación ámbar, y, por tanto, se detendría la traducción. En ausencia de dicho codón de terminación, dichas células huésped no supresoras, preferentemente E. coli. En presencia de dicho codón de terminación, se usarían células huésped supresoras.

15 Preferentemente, en el método, el vector o plásmido del paquete genético está bajo el control estrecho del elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de forma que la cantidad o el número de partículas de vector o fagemido que muestran menos de dos copias de la proteínas de fusión sobre la superficie de la partícula es inferior a aproximadamente un 20 %. Más preferentemente, la cantidad de partículas de vector o fagemido que muestran menos de dos copias de la proteína de fusión es inferior al 10 % de la cantidad de partículas que muestran una o más copias de la proteína de fusión. Lo más preferentemente, la cantidad es inferior al 1 %.

20 El vector de expresión puede ser capaz de expresar un polipéptido de unión, y se puede producir del siguiente modo: En primer lugar se sintetiza una biblioteca génica de polipéptidos de unión introduciendo una pluralidad de polinucleótidos que codifican diferentes secuencias de unión. La pluralidad de polinucleótidos pueden sintetizarse en una cantidad adecuada para unirse en combinación operable en un vector que se puede propagar para expresar una proteína de fusión de dicho polipéptido de unión. Como alternativa, la pluralidad de oligonucleótidos también se puede amplificar mediante reacción en cadena de la polimerasa para obtener suficiente material para expresión. Sin embargo, esto solo sería ventajoso si el polipéptido de unión estuviera codificado por una secuencia de polinucleótidos grande, por ejemplo, mayor de 200 pares de bases o, en ocasiones, mayor de 300 pares de bases. Por tanto, 25 preferentemente se forma una biblioteca sintética diversa, lista para seleccionar de dicha biblioteca diversa al menos un vectores de expresión capaz de producir polipéptidos de unión que tienen la función preseleccionada deseada y la propiedad de unión, tal como especificidad.

30 La molécula de ácido nucleico modificada aleatoriamente puede comprender las unidades de repetición identificadas anteriormente, que codifican todos los aminoácidos de origen natural o un subconjunto de los mismos. Dichas bibliotecas que contienen secuencias modificadas en las que un subconjunto específico de aminoácidos se usa para fines de modificación se denominan biblioteca "centradas". El miembro de dichas bibliotecas tiene una probabilidad mayor de un aminoácido de dicho subconjunto en la posición modificada, que es al menos dos veces mayor de lo normal, preferentemente al menos 3 veces o incluso al menos 4 veces mayor. Dichas bibliotecas también tienen un número limitado o menor de miembros de la biblioteca, de modo que el número de miembros reales de la biblioteca alcanza el número de miembros teóricos de la biblioteca. En algunos casos, el número de miembros de la biblioteca de una biblioteca centrada no es inferior a 10^3 veces el número teórico, preferentemente no inferior a 10^2 veces, lo más preferentemente no inferior a 10 veces,

45 Normalmente, las bibliotecas comprenden al menos 10 proteínas de fusión o potenciales agentes de unión o variantes de proteínas estructurales, preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 1.000, más preferentemente al menos 10^4 , más preferentemente al menos 10^5 , más preferentemente al menos 10^6 , más preferentemente al menos 10^7 , más preferentemente al menos 10^8 , más preferentemente al menos 10^9 , más preferentemente al menos 10^{10} , más preferentemente al menos 10^{11} , hasta 10^{12} , en los casos de métodos de expresión in vitro, tal como expresión en ribosomas, incluso un número más alto es viable.

50 Se dispone de varias alternativas para la fabricación del gen que codifica la biblioteca aleatorizada. Es posible producir el ADN mediante un abordaje completamente sintético, en el que la secuencia se divide en fragmentos solapantes que después se preparan como oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos se mezclan, y se hibridan entre sí calentando primero hasta aproximadamente 100 °C y, después, enfriando lentamente hasta la temperatura ambiente. Después de esta etapa de hibridación, el gen ensamblado sintéticamente se puede clonar directamente o se puede amplificar mediante PCR antes de la clonación.

60 Como alternativa, se pueden usar otros métodos para la mutagénesis dirigida a sitio para la generación del inserto de la biblioteca, tal como el método de Kunkel (Kunkel TA. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jan;82(2):488-92) o el método de DpnI (Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. Gen. 1994 Dec 30;151(1-2):119-23.).

65 Para varios fines, puede ser ventajoso introducir mutaciones silentes en la secuencia que codifica el inserto de la biblioteca. Por ejemplo, se pueden introducir sitios de restricción que facilitan la clonación o el intercambio modular de

partes de la secuencia. Otro ejemplo para la introducción de mutaciones silentes es la capacidad para "marcar" bibliotecas, que significa darles un codón específico en una posición seleccionada, lo que les permite (o a los clones seleccionados derivados de los mismos), por ejemplo, ser reconocidos durante las siguientes etapas, en las que, por ejemplo, diferentes bibliotecas con diferentes características se pueden mezclar y usar como mezcla en el procedimiento de adsorción.

Asimismo, se divulga un método para producir un oligómero de dominios de anticuerpo modular que se unen a una diana, que comprende las etapas de:

- proporcionar una biblioteca de oligómeros de los dominios de anticuerpo modular producidos de acuerdo con el método tal como se ha descrito
- poner en contacto dicha biblioteca con dicha diana en presencia de un ligando estructural,
- seleccionar un miembro de la biblioteca que se une a dicha diana en presencia de un ligando estructural, y
- fabricar una preparación del oligómero funcional.

El ligando estructural se puede seleccionar del grupo que consiste en una molécula efectora, FcRn, Proteína A, Proteína G, Proteína L y diana en CDR. Como ejemplo, la molécula efectora se puede seleccionar del grupo que consiste en CCD64, CD32, CD16, receptores Fc.,

Los oligómeros pueden ser dímeros seleccionados del grupo de VH/VL, CH1/CL, CH2/CH2, CH3/CH3, Fc y Fab, o cadenas sencillas de los mismos.

El método puede proporcionar una biblioteca que contiene al menos 10^2 clones independientes que expresan oligómeros funcionales de dominios de anticuerpo modular o variantes de los mismos.. También se proporciona un conjunto de clones independientes preseleccionados, que, por ejemplo, tiene afinidad madurada, en el que el conjunto comprende, preferentemente, al menos 10, más preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 1000, más preferentemente al menos 10000, incluso más preferentemente más de 100.000 clones independientes. Dichas bibliotecas, que contienen los conjuntos preseleccionados son fuentes preferidas para seleccionar los anticuerpos modulares de alta afinidad.

Las bibliotecas como se usan de acuerdo con la invención comprenden, preferentemente, al menos 10^2 miembros de la biblioteca, más preferentemente al menos 10^3 , más preferentemente al menos 10^4 , más preferentemente al menos 10^5 , más preferentemente al menos 10^6 miembros de la biblioteca, más preferentemente al menos 10^7 , más preferentemente al menos 10^8 , más preferentemente al menos 10^9 , más preferentemente al menos 10^{10} , más preferentemente al menos 10^{11} , hasta 10^{12} miembros de una biblioteca, derivados preferentemente de una molécula parental, que es un anticuerpo modular funcional como un armazón que contiene al menos una función específica o resto de unión, y derivados de los mismos para modificar un nuevo sitio de unión aparte del original, la región de unión funcional de dicho resto parental.

Normalmente, las bibliotecas contienen además variantes del anticuerpo modular, resultante de la mutagénesis o técnicas de aleatorización. Estas variantes incluyen anticuerpos inactivos o no funcionales. Por tanto, se prefiere que dichas bibliotecas se sometan a detección selectiva con el ensayo adecuado para determinar el efecto funcional. Bibliotecas preferidas comprenden al menos 10^2 variantes de anticuerpos modulares, más preferentemente al menos 10^3 , más preferentemente al menos 10^4 , más preferentemente al menos 10^5 , más preferentemente al menos 10^6 , más preferentemente al menos 10^7 , más preferentemente al menos 10^8 , más preferentemente al menos 10^9 , más preferentemente al menos 10^{10} , más preferentemente al menos 10^{11} , hasta 10^{12} variantes o más para proporcionar un repertorio muy diverso de anticuerpos para seleccionar los mejores ligantes adecuados. Cualquiera de estas bibliotecas sintéticas se puede generar usando métodos de mutagénesis como se divulga en el presente documento.

Preferentemente, la biblioteca es una biblioteca de levaduras y la célula huésped de levadura exhibe en la superficie los oligómeros con la actividad biológica. La célula huésped de levadura se selecciona, preferentemente, de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia* y *Candida*. Lo más preferido, la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*.

También se divulga una biblioteca de alta calidad que contiene al menos 10^2 clones independientes de dímeros funcionales de dominios de anticuerpo modular o variantes de los mismos, o los conjuntos de clones optimizados o preseleccionados, por ejemplo los clones de afinidad madurada, en los que los conjuntos contienen al menos 10 clones independientes que se unen a una diana y a un ligando estructural. La diana puede ser un ligando que se une a una molécula parental sujeto a a variación de aminoácidos. La molécula parental puede ser un oligómero funcional, en particular un Fc funcional o un Fab funcional, o partes de los mismos.

La biblioteca puede contener dímeros funcionales de dominios de anticuerpo modular que se unen a una diana y a un ligando estructural, y al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferido al menos un 40 % de los dímeros funcionales se unen a CD64. Esto es particularmente preferido con un anticuerpo modular que contiene dominios CH2, tal como un armazón Fc.

Como alternativa, la biblioteca puede contener dímeros funcionales de dominios de anticuerpo modular que se unen a una diana y a un ligando estructural, y al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferido, al menos un 40 % de los dímeros funcionales se unen a la proteína A. Esto es particularmente preferido con un anticuerpo modular que contiene los dominios CH2 y CH3, tal como un armazón Fc.

Como alternativa, la biblioteca puede contener dímeros funcionales de dominios de anticuerpo modular que se unen a una diana y a un ligando estructural, y al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferido al menos un 40 % de los dímeros funcionales se unen a la misma diana de CDR. Esto es particularmente preferido con los anticuerpos modulares que contienen una región variable, tal como un armazón Fab con especificidad por una única diana de CDR.

Como se conoce en la técnica, existen varias tecnologías de expresión y selección que se pueden usar para la identificación y aislamiento de proteínas con determinadas características y afinidades de unión. incluyendo, por ejemplo, tecnologías de expresión, tales como celulares y no celulares, en particular sistema de expresión movilizados. Entre los sistemas celulares, se pueden usar expresión en fagos, expresión en virus, expresión en levaduras o en otras células eucariotas, tales como expresión en células de mamífero o de insectos. Los sistemas movilizados están relacionados con los sistemas de expresión en la forma soluble, tales como sistemas de expresión in vitro, entre ellos la expresión en ribosomas, expresión de ARNm o expresión de ácido nucleico.

Los métodos para la producción y detección selectiva de las variantes de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Métodos generales para la biología molecular de los anticuerpos, expresión, purificación, y detección selectiva se describe en Antibody Engineering, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76.

Una biblioteca se puede diseñar como biblioteca exclusiva que contiene al menos un 50 % de formatos específicos, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, o los que consisten principalmente en formatos de anticuerpo específicos. Se prefieren los formatos de anticuerpo específicos, de modo que la biblioteca preferida se seleccione del grupo que consiste en una biblioteca de VH, biblioteca de VHH, biblioteca de Vkappa, biblioteca de Vlambda, biblioteca de Fab, una biblioteca de CH1/CL, una biblioteca de Fc y una biblioteca de CH3. Las bibliotecas caracterizadas por el contenido de moléculas compuestas que contienen más de un dominio de anticuerpo, tal como una biblioteca de IgG o biblioteca de Fc son especialmente preferidas. Otras bibliotecas preferidas son las que contienen receptores de linfocitos T, que forman bibliotecas de receptores de linfocitos T.. Otras bibliotecas preferidas son bibliotecas de epítomos, en las que la proteína de fusión comprende una molécula con una variante de un epítomo, que también permite la selección de moléculas competitivas que tienen una función de unión similar pero una funcionalidad diferente. Un ejemplo es una biblioteca de TNF alfa, en la que trímeros de la proteína de fusión de TNF alfa se expresan mediante un único paquete genético.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los ejemplos siguientes. Dichos ejemplos son, sin embargo, meramente representativos de los métodos de la práctica de una o más realizaciones de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de la biblioteca de Fcab no centrada (Fcab01) y expresión en superficie de fagos

La estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1, publicada en la base de datos de Brookhaven como la entrada 1OQO.pdb, se usó para ayudar en el diseño de la biblioteca de Fcab.

La secuencia que se usó como base para la construcción de la biblioteca de Fcab se proporciona en la SEC ID N° 1 (Figura 3). En esta secuencia, el primer aminoácido corresponde a Glu 216 de IgG1 humana (numeración de la UE: de acuerdo con la base de datos de la IMGT (http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/Proteins/protein/human/IGH/IGHC/Hu_IGHC_allgenes.html; lookup 2007 06 25). Es el primer residuo de la región bisagra de la IgG1 humana, que se proporciona como: (E)PKSCDKTHTCPPCP) de la región bisagra de la región constante de la cadena pesada de la IgG1) El segundo-último residuo de la SEC ID N° 1 (Figura 3) corresponde a Gly 446 de la IgG1 humana (numeración de la UE: IMGT: número de residuo 129 del dominio CH3 de la IgG1 humana).

Después del detallado análisis de la estructura de 1oqo.pdb y mediante inspección visual de los residuos que forman los bucles que conectan las hebras beta, se decidió aleatorizar los residuos 144 145 y 146, que forman parte del bucle que conecta la hebra beta A-B. así como 198, 199, 200, 203 y 204, que forman parte del bucle que conecta la hebra beta E-F de la SEC ID N° 1 (FIGURA 3). Además de los residuos mutados, se insertaron 5 residuos en el número de residuo 198 de la SEC ID N° 1 (Figura 3). En la SEC ID N° (Figura 4), se proporciona la secuencia del inserto de la biblioteca de la biblioteca Fcab01 en la que todas las posiciones de los residuos aleatorizados así como los 5 residuos insertados se designan con la letra X.

El gen modificado por ingeniería se produjo mediante una serie de reacciones de PCR usando cebadores degenerados seguido de ligación de los productos de la PCR resultantes. Para facilitar la unión, algunos de los codones de la secuencia de nucleótidos que codifica la SEC ID N° 1 (Figura 3) se modificaron para producir sitios de restricción sin cambiar las secuencias de aminoácidos (mutaciones silentes). Para la inserción en el vector de clonación pHEN1 (Nucleic Acids Res. 1991 Aug 11; 19(15):4133-7. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G.) en marco con la señal de secreción pelB, se usó el sitio de restricción NcoI cerca del extremo 3' de la señal de secreción pelB. Para los residuos aleatorizados, se eligió el codón NNS (código IUPAC, en el que S significa los nucleótidos C y G) que codifica los 20 aminoácidos de origen natural, pero evita 2 de 3 codones de terminación. Otros codones tales como, por ejemplo, el NNB (en el que B significa los nucleótidos T, C y G) también se pueden usar. La secuencia modificada se proporciona como una secuencia de nucleótidos en la SEC ID N° 3 (Figura 5). Esta secuencia también incluye los sitios de restricción usados para clonar en el vector de expresión en fagemido pHEN1, es decir, un sitio NcoI en el extremo 5' y un sitio NotI en el extremo 3'.

Las secuencias de los cebadores para PCR usados para ensamblar el dominio CH3 mutado se proporcionan en la SEC ID N° 4 a SEC ID N° 9.

SEC ID N° 4 (cebador para PCR EPKSNCO)

ccatggccgagcccaaatctgtgacaaaactc

SEC ID N° 4 (cebador para PCR CH3LSAC)

agtcgagctcgtcacgggatggggcaggg

SEC ID N° 6 (cebador para PCR CH3CSAC)

gtacgagctcnnnsnnsnnscaagtcagcctgacctgcctgg

SEC ID N° 7 (cebador para PCR CH3CHIN)

tgccaagcttgctgtagaggaagaaggagccg

SEC ID N° 8 (cebador para PCR CH3RHIN)

tgccaagcttaccgtggnnsnnsnnsaggtggnnsnnsaggacgtcttctcatgctccg

SEC ID N° 9 (cebador para PCR CH3RNOT) agttgcggccgctttaccggagacagggagag

La Figura 1 muestra una presentación esquemática de los fragmentos de PCR generados para el ensamblaje del gen mutado y los cebadores usados.

Se usó ADNc de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 3D6 (Felgenhauer M, Kohl J, Ruker F. Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of Heavy L-chains of a human mono-clonal antibody specific to HIV-1- gp41. Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25;18(16):4927.) como molde para las reacciones de la PCR. Los 3 productos de la PCR se digirieron con SacI y/oHindIII respectivamente y se unieron- El producto de la unión se digirió adicionalmente con NcoI y NotI y se ligó en el vector fagemido de expresión en superficie pHEN1, que se habían digerido previamente con NcoI y NotI, El producto de la unión se transformó después en E. coli mediante electroporación. Una serie de clones seleccionados se controló mediante análisis de restricción y mediante secuenciación de ADN y se halló que contenían el inserto según lo planeado, incluyendo las secuencias aleatorizadas correctamente insertadas. Para las etapas siguientes de la preparación de fagos se siguieron protocolos estándar. En resumen, la mezcla de la unión se transformó después en células TG1 de E. coli mediante electroporación. Posteriormente, las partículas de fago se rescataron de las células TG1 de E. coli con el fago colaborador M13-KO7. Después, las partículas de fago se precipitaron del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en dos etapas, se disolvieron en agua y se usaron para la selección mediante adsorción o, como alternativa, se almacenaron a -80°C

Ejemplo 2: Construcción de la biblioteca de Fcab centrada (Fcab02) y expresión en superficie de fagos

Como se describe en el Ejemplo 1, se preparó una biblioteca de Fcab en la que las posiciones aleatorizadas de la biblioteca están completamente aleatorizadas, es decir, están codificadas por un codón, tal como NNS NNB, NNK, NNN u otros.

Por claridad, el significado de letras tales como N, B, S o K se define en el código de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC, que se proporciona en la tabla siguiente:

Tabla 1. Código de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC

Símbolo	Significado	Ácido nucleico
A	A	Adenina
C	C	Citosina
G	G	Guanina
T	T	Timina
U	U	Uracilo
M	A o C	
R	A o G	
W	A o T	
S	C o G	
Y	C o T	

K	G o T
V	A o C o G
H	A o C o T
D	A o G o T
B	C o G o T
X	G o A o T o C
N	G o A o T o C

Fuente: Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. A Cornish-Bowden, Nucleic Acids Res. 1985 May 10; 13(9): 3021-3030.

- 5 Estos codones indicados anteriormente están diseñados de un modo tal que los 20 aminoácidos están codificados por ellos. Puede ser preferible elegir subconjuntos de los posibles aminoácidos. Se pueden encontrar ejemplos en la bibliografía (**Fellouse FA**, Li B, Compaan DM, Peden AA, Hymowitz SG, Sidhu SS. Molecular recognition by a binary code. J Mol Biol. 2005 May 20;348(5):1153-62. Epub 2005 Apr 1.; Fellouse FA, Wiesmann C, Sidhu SS. Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: a dominant role for tyrosine in antigen recognition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 24; 101 (34):12467-72. Epub 2004 Aug 11.). Las bibliotecas centradas que, por ejemplo, permiten que sólo se puedan construir 4 tipos de aminoácidos diferentes, por ejemplo usando el codón KMT, que codifica los aminoácidos Ser, Tyr, Ala y Asp.

- 15 Una biblioteca Fcab centrada, designada Fcab02, se ha construido del mismo modo que se describe en el ejemplo 1 a excepción de que los codones NNS se sustituyeron por los codones KMT.

Por tanto, la letra "X" en la SEC ID N° 2 (Figura 4) ahora significa "S, Y, A y D" (Ser, Tyr, Ala y Asp) con el fin de describir la biblioteca Fcab02 centrada

20 Ejemplo 3: Construcción de una biblioteca de expresión en superficie de fagos con residuos de aminoácidos adicionales entre el inserto de la biblioteca (pareja de unión) y p3

- 25 Con el fin de investigar la accesibilidad del potencial sitio de unión de la proteína expresada se realiza un ensayo de unión: la suspensión de fagos se hace reaccionar con microplacas (o inmunotubos) revestidas con AcMo anti-myc 9E10. Después de lavar, los fagos unidos se detectan con el conjugado anti-M13-enzima. Como control, el fago colaborador, que no expresa la proteína de fusión y el marcador myc, se hace reaccionar con las placas. Otros controles son la reacción de los fagos con placas no revestidas y la reacción de los fagos con antisuero que reconoce la pareja de fusión--p3 de los fagos.

- 30 Idealmente, la reactividad anti-myc de los fagos que expresan la proteína de fusión-p3 deberá dar lecturas en ELISA muy claras, mientras que las reacciones de fagos colaboradores al anti-myc-mAb no deberán estar por encima del valor de fondo (placas no revestidas). La estructura de un dímero de CH3 expresado en la superficie de un fago M13 a través de la unión a la proteína III como anclaje es tal que cada CH3 está anclado a la proteína III usando varias longitudes de ligadores y composiciones. Por tanto, el dímero CH3 se expresa, preferentemente, mediante dos anclas.

- 35 Optimización del ligador:

- 40 El ligador entre la proteína que se va a expresar y la proteína ancla del paquete genético (en el caso del fago filamentoso, por ejemplo, p3), p8, pX, pIX, pVII) es especialmente importante si el potencial sitio de unión de la molécula expresada está en las proximidades espaciales de la partícula de fago. En las bibliotecas de anticuerpos que usan dominios variables y los sitios de unión a antígeno formados por los bucles CDR y expresan los miembros de la biblioteca como fusión en el amino-terminal con p3, el potencial sitio de unión a antígeno es alejado de la partícula de fago. Por tanto, la estructura del ligador entre miembros de la biblioteca y la proteína de la cubierta del fago no es importante. La modificación por ingeniería de los bucles de la parte inferior de los dominios de inmunoglobulina y la realización de expresión en fagos puede, no obstante, ser un proceso ineficiente y disminuye los rendimientos de los clones de unión a antígeno o, incluso, impedirlo. La variación del ligador entre una proteína miembros de la biblioteca y su pareja de fusión sobre la superficie puede resolver o puede al menos reducir este problema.

- 50 Con el fin de seleccionar secuencias de ligadores óptimas (en términos de longitud y flexibilidad, así como de estabilidad), se puede preparar una biblioteca de ligadores en la que la proteína de ancla en la superficie del paquete genético replicable se fusiona con una proteína de unión conocida que es, por motivos estéricos, considerablemente difícil de seleccionar.

- 55 Esta biblioteca de secuencias se puede modificar en longitud y contenido en aminoácidos.

Los métodos de selección de la biblioteca de ligadores para los ligadores óptimos dependen de la aplicación, pero básicamente debe ser para seleccionar todas las propiedades que se desea tener en determinada metodología. El enriquecimiento contra un antígeno difícil de seleccionar puede producir secuencias ligadoras que permiten a los miembros de la biblioteca de un buen acceso a los antígenos. La incubación en las soluciones de proteasas o en otras

condiciones adversas o pases frecuentes a través de células huésped en condiciones proteolíticas (por ejemplo, antiguos cultivos microbianos) puede ser una selección adecuada de los ligadores de expresión estables

- 5 Una biblioteca de ligadores se puede producir mediante cualquier tecnología de biblioteca bien conocida. Las longitudes de secuencia ligadora sintética pueden variar entre 10-500 aminoácidos. Como alternativa, el ligador puede ser proteínas completas que se sabe que son de naturaleza flexible.

Optimización del ligador Fcab01:

- 10 Como ejemplo, se puede usar la biblioteca Fcab01 (como se describe en el ejemplo 1) . Originalmente, esta biblioteca se clona en el vector pHEN1 de expresión en fagemidos usando los sitios de restricción NcoI y NotI. Cuando se clonan de esta manera, 18 residuos de aminoácidos están en entre el residuo de aminoácido en C-terminal del inserto de la biblioteca Fcab01 y el residuo de aminoácido N-terminal del fago M13 p3. La secuencia de esta región de unión se proporciona en la SEC ID N ° 10 SPGKAAAEQKLISEEDLNGAATVES - como se explica del siguiente modo: los
15 primeros 4 residuos, SPGK, son los 4 residuos en C-terminal del inserto de la biblioteca Fcab01, seguido de la secuencia de aminoácidos AAA, que son los residuos de aminoácidos codificados por el sitio de restricción NotI , seguido por la secuencia EQKLISEEDL que es el epítipo myc, seguido de NGAA, tras lo cual existe un codón de terminación ámbar, que se traduce en glutamina (Q) en las cepas supresores ámbar de E. coli, tal como TG1. Los 4
20 residuos en C-terminal de la SEC ID N° 10, TVES, son los 4 residuos en N-terminal del fago M13 p3 como están presentes en el vector pHEN1.

- Con el fin de construir un fago que expresa un inserto de Fcab con un aumento de la distancia entre el Fcab (la pareja de unión) y el cuerpo del fago (el paquete genético), se insertaron 5 residuos adicionales se insertan en el extremo C-terminal del inserto de Fcab rFcabRGD4, directamente cadena arriba del sitio de clonación NotI, lo que resulta en el
25 clon FcabRGD4L. FcabRGD4 es un Fcab que tiene un motivo de unión a integrina RGD insertado en el bucle EF del dominio CH3 y que se une a $\alpha\beta 3$ -integrina en el ELISA. Como una secuencia ligadora de mayor longitud, se usó la secuencia de aminoácidos EGGGS, que aparece 8 veces en la secuencia del fago M13 p3. La secuencia de aminoácidos resultante de FcabRGD4L tal como se expresa después de la clonación en pHEN1 se da en la SEQ ID N ° 11 (Figura 5). En la SEC ID N° 11 (Figura 5), los residuos de aminoácidos 198-204 representan el motivo RGD, el
30 residuo de aminoácido 237 es el residuo en C-terminal de la pieza de inserción Fcab, los residuos 238-242 representan la secuencia ligadora insertada (que es la diferencia con el pHEN1 no modificado), seguido del marcador myc, el codón de terminación ámbar y la secuencia p3.

- Para la clonación de la construcción la secuencia de FcabRGD4 se amplificó a partir de pHENFcabRGD4 (SEC ID N ° 12) usando los cebadores de PCR EPKSNCO (SEC ID N ° 4) y CH3rlink
35 actagcgccgcagagccaccctccttaccggagacaggagag (SEC ID N ° 13) y se clonó a través de los sitios de restricción NcoI y NotI en el vector pHEN1. El vector resultante, pHENFcabRGD4L (SEC ID N ° 14 / Figura 7), tiene la secuencia ligadora adicional en las posiciones de nucleótidos 3.057 a 3.071.

- 40 Los dos vectores fagemidos, pHENFcabRGD4 y pHENFcabRGD4L se transformaron en TG1 de E. coli. Posteriormente, las partículas de fago se rescataron de las células TG1 de E. coli con el fago colaborador M13-KO7. Después, las partículas de fago se precipitaron del sobrenadante del cultivo con PEG/NaCl en dos etapas, se disolvieron en agua y se usaron para el ELISA.

- 45 El ELISA del fago se realizó del siguiente modo:

- La suspensión de fagos se hace reaccionar con microplacas revestidas con $\alpha\beta 3$ -integrina (o inmunotubos). Después de lavar, los fagos unidos se detectan con el conjugado anti-M13-enzima. Como controles el fago colaborador, que no expresa la proteína de fusión y el marcador myc, se hace reaccionar con las placas así como las partículas de fago
50 portadoras de wtFcab sobre su superficie. Otros controles son la reacción de los fagos con placas no revestidas y la reacción de los fagos con antisuero que reconoce la pareja de fusión-Fcab de los fagos. Las partículas de fago con el ligador de mayor longitud resultante de pHENFcabRGD4L reaccionan más fácilmente con $\alpha\beta 3$ -integrina que las partículas de fago con el ligador original, tal como figura en pHENFcabRGD4, y, por lo tanto, dar una señal más fuerte en ELISA.

- 55 Se pueden realizar selecciones de fagos en las que las partículas de fago con wtFcab se mezclan con pequeñas cantidades de partículas de fago que llevan FcabRGD4 o FcabRGD4L. Después de varias (normalmente 3-5) rondas de adsorción se seleccionan, preferentemente, los fagos que expresan FcabRGD4L.

- 60 Ejemplo 4: Diseño de la biblioteca Fcab™

- El diseño de Bibliotecas Fcab (ilustrado en la Figura 2): posiciones de aminoácidos en no los bucles no CR de los dominios constantes CH3 de los anticuerpos se consideran para la aleatorización. Especialmente los bucles AB, CD y EF se considera como que están en un lado del dominio. Algunos de los criterios de diseño para la aleatorización en
65 una posición determinada se describen en el presente documento.

Los aminoácidos involucrados con frecuencia en interacciones anticuerpo-antígeno se describen en el presente documento para su inclusión en una biblioteca centrada.

Las bibliotecas con uso restringido de aminoácidos se ha demostrado que son suficientes para generar ligantes contra virtualmente cualquier antígeno (Sidhu y Fellhouse, NATURE CHEMICAL BIOLOGY VOLUME 2 page 682ff.; Koide et al PNAS, volumen 104 p6632-6637). La ventaja de tales bibliotecas restringidas (o centradas) es que pueden abarcarse completamente por las tecnologías actuales. Idealmente, el uso de aminoácidos refleja una utilización de aminoácidos naturales de la unión a los receptores de ligandos Sin embargo, se ha notificado que incluso las bibliotecas que utilizan sólo 2 aminoácidos (tirosina y serina) para obtener buenos resultados de la selección (en términos de frecuencia de los ligadores contra ligadores diferentes y en términos de afinidad).

Flexibilidad del bucle:

La proteína estructural puede requerir ciertas estructuras de bucle con el fin de mantener la estructura natural global. La aleatorización de muchas posiciones de los aminoácidos en los bucles e incluso el alargamiento de los bucles se puede facilitar generando determinadas secuencias en uno o en ambos lados de las posiciones aleatorizadas. Estas secuencias pueden ser secuencias flexibles con el fin de permitir la compensación por cualquier tensión con determinadas secuencias de la biblioteca en dicha posición.

Tabla 2: Ejemplos de bibliotecas Fcab™, centradas y no centradas

	nº de posiciones aleatorizadas	Diversidad teórica a nivel de aminoácidos	Número de clones bacterianos independientes
Fcab01	13	$8,2 \times 10^{16}$	$0,6 \times 10^9$
Fcab02	13, centrada	$6,7 \times 10^7$	$0,6 \times 10^9$
Fcab03	13	$8,2 \times 10^{16}$	$1,0 \times 10^9$
Fcab04	13, centrada	$6,7 \times 10^7$	$0,8 \times 10^9$
Fcab05	15	$1,3 \times 10^{18}$	$0,8 \times 10^9$
Fcab06	15, centrada	$1,3 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9$

La biblioteca Fcab01 se describe en los ejemplos anteriores. El espacio de la secuencia de los diseños de la biblioteca centrada Fcab02, Fcab04 y Fcab06 están cubiertos por los tamaños reales de las bibliotecas bacterianas de aproximadamente 10^9 . Por el contrario, las bibliotecas completamente aleatorias Fcab01, Fcab03 y Fcab05 en realidad están insuficientemente representadas.

Diseño de aleatorización de bucle en levaduras

De manera similar a los ejemplos mencionados anteriormente para el diseño de la biblioteca Fcab y la generación de la biblioteca en bacterias, se generaron bibliotecas de levaduras. Como se muestra en la tabla 3 se generaron varias combinaciones de bucles AB modificados, bucles CD y bucles EF. El bucle AB modificado en este ejemplo varía del aminoácido 358 a 362 (secuencia wt "LTKNQ"), el bucle CD modificado del aminoácido 384 a 388 (secuencia wt "LTKNQ"), y el bucle EF de 413 a 419 (secuencia wt "DKSRWQQ").

Como se ha mencionado anteriormente, "X" representa una aleatorización completa, y "Z" para un diseño centrado. Aminoácidos que se insertaron y no están presentes en el armazón de Fc silvestre, se escriben entre paréntesis en la tabla 3. Para dichas bibliotecas, en las que no se modificaron los bucles, el código de aminoácidos de una letra de la respectiva secuencia wt se cita en la tabla. Como el número de combinaciones teóricas excede en la mayoría de estas bibliotecas el número experimental de los clones, el número de clones de levadura independientes generados se muestra en la última columna.

Tabla 3: Ejemplos de bibliotecas Fcab™, centradas y no centradas, con mutaciones e inserciones en el bucle AB, el bucle CD y el bucle EF.

Nombre de la biblioteca	tamaño teórico	Bucle AB	Bucle CD	Bucle EF	Clones independientes
Fcab05	$2,0 \times 10^{22}$	ZXXXX	NGQPE	(XXXXX)XXXRWXX	$2,2 \times 10^4$
Fcab05sABCD	$7,5 \times 10^{31}$	XXXXX	XXXXX	(XXXXX)XXXRWXX	$1,1 \times 10^6$
Fcab05sCD	$6,8 \times 10^{29}$	ZXXXX	XXXXX	(XXXXX)XXXRWXX	$8,6 \times 10^6$
Fcab05sAB	$1,3 \times 10^{24}$	XXXXX	NGQPE	(XXXXX)XXXRWXX	53×10^7
Fcab07	$3,4 \times 10^{10}$	LTKNQ	NGQPE	XXXXXXX	$5,3 \times 10^7$
Fcab07AB	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXX	$4,8 \times 10^6$
Fcab07ABb	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXX	$1,3 \times 10^7$
Fcab07b	$3,4 \times 10^{10}$	LTKNQ	NGQPE	XXXXXXX	37×10^7
Fcab07CD	$1,2 \times 10^{18}$	LTKNQ	XXXPE	XXXXXXX	$1,9 \times 10^7$
Fcab07CDAB	$3,9 \times 10^{25}$	XXXXX	XXXPE	XXXXXXX	$1,7 \times 10^7$

Fcab08	$3,4 \times 10^7$	XXXXX	NGQPE	DKSRWQQ	$8,5 \times 10^6$
Fcab08EF	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXXX	22×10^7

Ejemplo 5: Clonación de bibliotecas de expresión en levadura mediante vector de recombinación homóloga

El pYD1 (Invitrogen) se utiliza como el vector básico. El vector se modifica de la siguiente manera, con el fin de eliminar un sitio XhoI: pYD1 se escinde con XhoI, se trata con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se vuelve a ligar. La secuencia resultante se da en pYD1dX (SEC ID N° 15 / Figura 8). pYD1dX contiene un sitio de restricción BamHI único en la posición 921/925 y un sitio de restricción NotI único en la posición 963/967. Se abre con estas dos enzimas de restricción. Un inserto que codifica CH1-bisagra-CH2-CH3 de la IgG1 humana se prepara mediante PCR a partir de ADNc que codifica la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal IgG1 humana. En este inserto se introduce una mutación puntual usando procedimientos estándar para mutar el residuo de cisteína en C-terminal del dominio CH1 a una serina. El inserto se amplifica usando cebadores de PCR que se unen a un sitio de restricción BamHI y NotI en ambos extremos respectivamente. Estos sitios de restricción se utilizan después para clonar el inserto en pYD1dX para producir el vector de expresión pYD1dXFc (SEC ID N° 16 / Figura 9).

El codón mutado en el extremo C-terminal del dominio CH1 (Cys a Ser) está en las posiciones 1233 a 1235 en la secuencia de pYD1 DxFc. El codón de terminación del inserto está en la posición 1917/1919.

Este vector se utiliza como un control positivo para la expresión de CH1-bisagra-CH2-CH3 humano sobre la superficie de la levadura y como punto de partida para la construcción del vector pYD1CH12 vector (ver más adelante).

Clonación de las bibliotecas

La clonación de las bibliotecas en las que las mutaciones se introducen en los bucles estructurales de los dominios CH3 se realiza en la levadura mediante recombinación homóloga (reparación de huecos). Con este fin, se prepara un vector receptor que carece del dominio CH3: se escinde el pYD1dXFc con XhoI (posición 1603/1607) y NotI (posición 1921/1925), el fragmento grande se prepara mediante electroforesis en gel preparativa, se trata con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se vuelve a ligar. Este procedimiento reconstituye un sitio XhoI único (posición 1603/1607) y el vector dado pYD1 CH12 (SEC ID N° 17 / Figura 10). Posteriormente, pYD1CH12 se escinde con XhoI y se utiliza como vector receptor para la reparación de huecos en la levadura.

Como alternativa, para las bibliotecas indicadas en la Tabla 3 se construyó un vector receptor diferente, que comprendía sólo la región bisagra, los dominios CH1 y CH2, pero sin el dominio CH3. En este vector, el dominio CH1 se eliminó cortando con BamHI (posición: 921/926) y XhoI (posición: 1603/1608). En su lugar, los autores introdujeron un fragmento producido mediante PCR que comprende la región bisagra, el dominio CH2 y los correspondientes sitios de enzimas de restricción. El plásmido resultante es pYD1_dX_dCH1_Fcab_wt (SEC ID N° 428 / Figura 29). En una etapa adicional, los autores eliminaron el dominio CH3 del último plásmido digiriendo con XhoI (1309/1314) y NotI (1626/1633) y se sustituyó por dos marcadores secuenciales: el marcador V5 seguida del marcador His6. Se obtuvo esta secuencia mediante amplificación por PCR a partir del vector pYD1 y se clonó utilizando los sitios de enzimas de restricción XhoI y NotI. El plásmido final, pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt (SEC ID N° 427 / Figura 28), se utilizó como el vector receptor biblioteca. El pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt codifica para un fragmento de la IgG1 humana a partir de la región bisagra y terminando en el comienzo de dominio CH3. Contiene un único sitio de restricción BamHI (921/926), XhoI (1309/1314) y NotI (1422/1429). Estos 2 últimos se usan para la introducción de las bibliotecas CH3 mediante recombinación de homóloga. El vector pYD1_dX_dCH1_Fcab_wt se utiliza como un control positivo para la expresión de bisagra-CH2-CH3 humano sobre la superficie de la levadura y pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt como punto de partida para la construcción de las bibliotecas enumeradas en la Tabla 3.

Como fuente del inserto para pYD1dXFc, se usan las bibliotecas de Fcab Fcab01 (SEC ID N°18), Fcab02 (SEC ID N°19), Fcab03 (SEC ID N° 20), Fcab04 (SEC ID N° 21), Fcab05 (SEC ID N°22) y Fcab06 (SEC ID N°23). Estas bibliotecas se preparan mediante síntesis de ADN estándar y contienen restos aleatorizados, así como residuos insertados en el bucle AB (entre los residuos 359 y 361 (numeración de la UE)), así como en el bucle EF (entre los residuos 413 y 419 (numeración EU)) del dominio CH3 de la IgG1 humana. A partir de este ADN sintético, el inserto para la reparación de huecos en la levadura se amplifica mediante PCR usando el par de cebadores para PCR

gapch35

caacaaggccctgctgccccatcgagaagaccatctccaaggccaaggccagcctcgagaaccacaggtgtac
accctgccc (SEC ID N° 24) y

gapfcs3

gagaccgaggagagggttagggataggcttaccttgaagggccctctagactcgatcgagcgccgctcatttacc
ggagacagggagagctc ttc (SEC ID N° 25)

100 mg del vector pYD1CH12 escindido con XhoI y 100 mg del inserto se mezclan y se transforman en la cepa EBY100 de *Saccharomyces* (Invitrogen) utilizando el procedimiento de acetato de litio de acuerdo con el siguiente protocolo, que se mejora con un factor de 100 para transformar la cantidad requerida de células y de ADN. En resumen, para una única transformación de 1 µg de ADN del vector y 1 µg de ADN del inserto se inoculan 10 ml de YPD (2 % de peptona, 2 % de dextrosa (D-glucosa)) con una colonia de levaduras y se agita durante la noche a 30°C. La DO600 del cultivo durante la noche se determina y el cultivo se diluye hasta una DO600 de 0,4 en 50 ml de YPD y se cultivan durante 2--4 horas adicionales. Las células se sedimentan a 2.500 rpm y se resuspenden en 40 ml de 1X TE (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM). Las células se sedimentan de nuevo a 2.500 rpm y se resuspenden en 2 ml de LiAc/0,5X TE 1M seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. 1 µg de ADN del vector, 1 µg del inserto y µg de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado (2 mg/ml) se mezclan con µl de la suspensión de levadura. Se añaden 700 µl de LiAc 1M/40 % PEG- 3350/1X TE y se mezclan con la suspensión de levadura/ADN, seguido de incubación a 30 °C durante 30 minutos. Se añaden 88 µl de DMSO, se mezclan y la mezcla se incuba a 42°C durante 7 minutos, seguido de centrifugación en una microcentrífuga durante 10 segundos. Después se retira el sobrenadante, el sedimento celular se resuspende en 1 ml de 2X TE y se vuelve a sedimentar. El sedimento se resuspende después en 500-100 µl de TE y se siembra en placas con dextrosa mínima que contiene leucina (10 g/l de base de nitrógeno para levadura, 20 g/l de dextrosa, 0.1 g/l de leucina, 15 g/l de agar). Tras la incubación de las placas a 30 °C durante de 2 a 4 días, aparecieron colonias únicas que se recolectaron después.

Como fuente del inserto para el vector pYD1dX_dCH1dCH3, se usaron las bibliotecas Fcab enumeradas en la Tabla 3. Estas bibliotecas se preparan mediante síntesis de ADN estándar y contienen residuos aleatorizados así como residuos insertados en el bucle AB, y el bucle CD, así como en el bucle EF del dominio CH3 de la IgG1 humana (véase la Tabla 3). A partir de este ADN sintético, el inserto para la reparación de huecos en la levadura se amplifica mediante PCR utilizando los oligos YCH3.25rec.back y YCH3.25rec.opt.for (los cebadores utilizados se enumeran a continuación). La mezcla de transformación básica comprende 2 µg de pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt escindido con XhoI y 1 µg del ADN del inserto, que se mezclan y transforman en la cepa de *Saccharomyces* EBY100 (Invitrogen) usando el procedimiento con acetato de litio, que se mejora con un factor de 100 para obtener la cantidad requerida de transformantes. En resumen, para una única transformación de 1 µg de ADN del vector y 1 µg de ADN del inserto se inoculan 10 ml de YPD (2 % de peptona, 2 % de dextrosa (D-glucosa)) con una colonia de levaduras y se agita durante la noche a 30°C. La DO600 del cultivo durante la noche se determina y el cultivo se diluye hasta una DO600 de 0,3 en 50 ml de YPD y se cultivan durante 6 horas adicionales o DO600 de 2,5. Las células se sedimentan a 2500 rpm, se lavan dos veces: primero con 25 ml de agua destilada y después con LiAc 100 mM; y, por último, se resuspenden en 500 µl de LiAc 100 mM. 2 µg de ADN del vector, 1 µg del inserto y 100 µg de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado (2 mg/ml) se mezclan con 50 µl de la levadura en una solución que contiene PEG3500 (33 %p/v) y LiAc100mM en un volumen final de 360 µl. Después de una buena homogeneización, las levaduras se mantienen a 30°C durante 30 minutos y, después, a 42 °C durante 45 minutos. Después, se retira el sobrenadante y el sedimento celular se resuspende en YPD y se deja que las células se recuperen durante otros 60-90 minutos a 30°C. Después, el sedimento se incuba en medio selectivo (placas y/o líquido, véase más adelante) a 30°C durante 2 días. La diversidad de la biblioteca se determina mediante el número de células individuales cultivadas hasta colonias en placas que se han preparado e inoculado inmediatamente después del período de recuperación.

Lista de cebadores

- a) CH3seqs/2 (SEC ID N° 429): 5'-AAGGAGTACAAGTGCAAGG-3'
b) cebadores inversos:

CDmut_back (SEC ID N° 430): 5'-GCT CTC CCA CTC CAC G-3'

CDmut_back (SEC ID N° 430): 5'-CAC GGT GAG CTT GCT GTA GAG-3'

ABMUT5/2_back (SEC ID N° 432): 5'-CTCATCCCGGGATGGG-3'

- c) cebadores directos (X= trinucleótido, síntesis de aminoácidos aleatorizados) CDmut5cod_for (SEC ID N° 433):

5'-GTG GAG TGG GAG AGC X X X X AAC AAC TAC AAG ACC ACG-3' EFMUT7cod_for (SEC ID N° 434):

5'- AGC AAG CTC ACC GTG X X X X X X GGG AAC GTC TTC TCA TGC-3' EFMUT3+2_for (SEC ID N° 435):

5 5'- AGC AAG CTC ACC GTG X X X AGG TGG X X GGG AAC GTC TTC TCA TGC-3' ABMUT5 (wt)_for (SEC ID N° 436):

5'-CCA TCC CGG GAT GAG X X X X X GTC AGC CTG ACC TGC CTG G-3'

d) CH3seqAS (SEC ID N° 437): 5'-TAGAATCGAGACCGAGG-3'

10 e)YCH3.25rec.opt.for (SEC ID N° 438): 5'-A CCA TCT CCA AGG CCA AGG-3'

f)Ych3.25rec.back (SEC ID N° 439): 5'-AAG GGC CCT CTA GAC TCG-3'

Cultivo - Inducción

15 Las bibliotecas de levaduras recolectadas (bibliotecas y Fcab) se inoculan en 10 ml de medio SD-CAA (10 g/l de base de nitrógeno para levaduras, 10 g/l de aminoácidos, y 20 g/l de dextrosa. 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de NaH₂PO₄·2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄·7H₂O) y se cultivan en un agitador a 250 rpm a 28 °C durante 6.8 horas. La DO600 del cultivo se determina y el cultivo se diluye hasta una DO600 de 0,2 y se cultiva en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO600 DE 1-2. Las células se recolectan mediante centrifugación (3.000 rpm /5 min/ 4° C) y se resuspenden en medio de inducción SG/R-CAA (10 g/l de base de nitrógeno de levadura. 10 g/l de casa aminoácidos, y 20 g/l de galactosa, 10 g/l de rafinosa, 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de NaH₂PO₄·2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄·7H₂O). Los cultivos se inducen mediante incubación durante 2 días en un agitador a 250 rpm a 20°C y después se analizan y clasifican. Como alternativa, los cultivos se inducen mediante incubación durante 1 día en un agitador a 250 rpm a 37°C y después se analizan y clasifican.

25

Control de calidad de las bibliotecas y Fcab

Las bibliotecas y Fcab se analizan para determinar su nivel de expresión y la calidad de los Fcab expresados dos días después de la inducción con medio SD-CAA. El nivel de expresión se analiza usando antisuero anti-IgG-Fc humano policlonal (Sigma). Con este fin, 0.5x10⁶ células de la biblioteca se diluyen en 1 ml de tampón de tinción (SB), que comprende OBS con 2 % de BSA. Las células se sedimentan y se tiñen con 100 ul de SB que contiene antisuero anti-IgG-Fc-PE humano diluido a 1/2000 (Sigma) durante 30 minutos en hielo, se lavan dos veces con SB y después se analizan en el FACS. En general, 70-80 % de todas las células en cada biblioteca expresan Fcab sobre su superficie celular. Para analizar el plegamiento correcto de Fcab, se realiza tinción con proteína A. De nuevo, 0,5x10⁶ células de la biblioteca se diluyen en 1 ml de tampón de tinción SB, las células se sedimentan y tiñen con 100 ul de SB que contiene 1 ug/ml de Prot- A-FITC (Fluka) durante 30 minutos con hielo, se lavan dos veces con SB y después se analizan en el FACS. Por lo general, las bibliotecas y Fcab como se ha descrito anteriormente muestran 40 % de células positivas a la proteína A.

40 Con el fin de analizar si los Fcab se expresan como dímeros sobre la superficie de las células se realiza una tinción con CD64 humano. 5x10⁵ células se sedimentan y se tiñen 30 minutos en hielo con 50 ul de SB que contiene 1 ug/ml de cd64 (R&D Systems). Después de una etapa de lavado, las células se resuspenden en 50 ul de SB que contiene 1 ug/ml de Penta His Alexa Fluor 488 (QIAGEN) y se incuban otros 30 minutos en hielo. Las células se lavan y se resuspenden en 200 ul de SB helado para análisis con FACS. Como control, las células se incuban con equivalente de Penta His Alexa Fluor 488, sin preincubación con CD64. Tras la incubación, las células se lavan una vez con SB helado y se analizan en el FACS. Por lo general, > 50 % de todas las células en cada biblioteca expresan Fcab diméricos sobre su superficie celular.

Biotinilación del antígeno (Her2)

50 El antígeno recombinante, por ejemplo Her2 (Bendermedsystems) se realizó con el sistema EZ de Pierce de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En pocas palabras, el antígeno se dializa contra PBS, se diluye a 1 mg/ml en PBS y se mezcla con sulfo-LC-LC-biotina 10mM (EZ link, Pierce). que se disolvió previamente en agua. La proporción final entre antígeno y biotina es 1:3 y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, la mezcla se "dializa" contra PBS usando columnas Vivaspin MWCO3000 (Sartorius) (5x8", 4.000 rpm). Por último, la concentración del antígeno biotinilado (Her2) se analiza mediante HPLC y los alícuotas se almacenan a -20°C.

La calidad del antígeno biotinilado se analiza mediante LISA. En primer lugar, las placas se revisten con un anticuerpo anti-HEr2 (p. ej., Herceptin) a 10 ug/ml en PBS, 100 ul/pocillo durante la noche a 4°C. después, la placa se lava 3 veces con tampón de lavado (WB)(PBS + 0,05 % de Tween20) y se bloquea mediante tampón de bloqueo (BB) (PBS + 2 % BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con WB, se añaden diferentes concentraciones de Her2-biotina en 100 ul/pocillo de BB durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado 3 veces con WB. Por último, la placa se incuba con 1-25.000 de estreptavidina-HRP (GE healthcare) en BB durante 1 hora a temperatura ambiente y se lava 3 veces con WB. El color se desarrolla añadiendo 100 ul/pocillo del sustrato TMB (Sigma) tras aproximadamente 10 minutos, la reacción se detiene añadiendo 100 ul/pocillo de 30 % de H₂SO₄. Los resultados se analizan con un lector de ELISA a 450-630 nm.

65

Ejemplo 6: Producción de Fcab específicos de antígeno (Her2) Selección de Fcab específicas de antígeno (Her2) usando FACS

Primera ronda de selección

Dos días antes de la clasificación con FACS, una biblioteca de levaduras que contiene $2,5 \times 10^8$ clones de Fcab se induce con medio SG/R- CAA para expresar los Fcab sobre la superficie celular como se ha descrito anteriormente. Tras dos días, la cantidad de células que cubren, por ejemplo, 19 veces la biblioteca ($= 2,5 \times 10^9$), se incuba durante 30 minutos en hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 2 ml de SB. Después, las células se lavan una vez con SB frío y después se incuban durante 30 minutos en hielo con estreptavidina-PE (de R&D systems) diluido a 1: 100 en SB. Las células se lavan dos veces con SB frío helado hasta una concentración final de 1×10^9 células / ml. Las tinciones control con 5×10^6 células / ml en 100 μ l se realizan sólo estreptavidina-PE, en ausencia de antígeno. Tanto la biblioteca completa como las tinciones control se analizan por ejemplo, un FACS ARIA de BD. Para configurar las puertas para la clasificación se utilizan las células control. Primero, se establece una puerta SSC FSC (G1) para identificar células de levadura sanas del gráfico del área de FSC frente a la anchura de FSC de G1 y solo se seleccionan las células que no se agregan en una nueva puerta (G2). Las células en G2 se analizan después para determinar la reactividad con estreptavidina-PE usando FSC frente a FL-2 (canal de PE). G3 se establece para inducir un 01, % de células positivas (falsas). Posteriormente, al menos 5×10^8 células teñidas (dos veces el tamaño de la biblioteca, idealmente más) se analizan con los parámetros como se ha indicado anteriormente y las células en G3 se clasifican en un tubo que contiene 2-3 ml de medio SD-CAA. Aproximadamente 5×10^5 células (Conjunto 1) se recogen en la primera ronda de selección y se propagan durante de 1 a 2 días, tras lo cual, las células se pueden almacenar a -80°C y los alícuotas se pueden inducir para expresar los Fcab como se ha descrito anteriormente. Tras dos días más puede tener lugar la siguiente ronda de selección.

Segunda ronda de selección:

El conjunto 1 seleccionado en la ronda 1 se induce para expresar el Fcab sobre su superficie como se ha descrito anteriormente. Al menos 5×10^6 células (que comprenden múltiples copias del conjunto 1) se incuban durante 30 minutos en hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 1 ml de SB. Después, las células se lavan una vez con SB frío y después se incuban durante 30 minutos en hielo con estreptavidina-PE (de R&D systems) diluido a 1:100 en SB junto con 2 μ g/ml de proteína A-FITC (Fluka). A continuación, las células se lavan dos veces con SB frío helado hasta una concentración final de 2×10^9 células / ml. Además, se realizan tinciones control en las que 5×10^6 células/ml del Conjunto 1 en 100 μ l se incuban con una mezcla de proteína A y estreptavidina-PE como se ha indicado anteriormente, pero sin la incubación con el antígeno (Her2). Además, 5×10^5 células en 100 μ l de un clon de levadura que expresa el fragmento Fc no aleatorizado de Fcab wt) se tiñen con Prot A - FITC como se ha descrito en lo que antecede en ausencia de estreptavidina-PE. Las células que expresan Fcab-wt se analizan en, por ejemplo, FACS ARIA de BD para configurar las puertas para la clasificación. Primero, se establece una puerta SSC FSC (G1) para identificar células de levadura sanas, del gráfico del área de FSC frente a la anchura de FSC de G1 y solo se seleccionan las células que no se agregan en una nueva puerta (G2). Las células en G2 se analizan después para determinar la expresión de la proteína A usando FSC frente a FL-1 (FITC). G3 se configura para cubrir las células positivas a la proteína A (50-60 % de la puerta parental) y G4 se configura para cubrir las células débilmente positivas a prot A (20-30 % de células parentales). G3+G4 incluirán aproximadamente el 70-80 % de todas las células en G2. Ahora, el conjunto de células teñidas para estreptavidina-PE en presencia de Prot A-FITC se usan para establecer el resto de las puertas de clasificación. Primero se comprueban G1 y G2 con el conjunto de células y, si es necesario, se ajustan. El conjunto de células tendrá menos episodios en G3 y, quizá también en G4, lo que indica que no todas las células del conjunto 1 expresan Fcab que se pliega como Fcab-wt. Usando el conjunto de células teñidas control, se prepara una nueva puerta para G3 y para G4. Las nuevas puertas se configuran en el gráfico de FSC y FL-2 (PE). Se prepara una puerta (G5) que incluye 0,1 % de células positivas a estreptavidina (falsas) en G3 y lo mismo se realiza para las células en G4, que da lugar a G6. En la siguiente etapa, al menos 5×10^6 células teñidas para HER2-biotina + estreptavidina-PE y Prot A-FITC se clasifican mediante FACS-ARIA. Las células se recogen de G5 (conjunto 2,1 y G6 (conjunto 2.2) en tubos separados que contienen 2-3 ml de medio de cultivo para levaduras. Cabe esperar entre 10 y 1000 clones de ambas puertas. Ambos conjuntos nuevos se propagan durante 1 o 2 días y se almacenan a -80°C . Las células de 2,1 y 2.2 se pueden usar para dirigir clasificación adicional en una tercera ronda o se pueden someter (preferentemente después de mezclar los dos clones de nuevo) a una ronda de aleatorización adicional del bucle AB (maduración de la afinidad) antes de clasificar adicionalmente en el FACS.

Maduración de la afinidad para clones/conjuntos determinados

Para la maduración de la afinidad, se introduce diversidad en determinados clones o en conjuntos de clones seleccionados, preferentemente solo en un bucle, aquí, el bucle AB. Con este fin, se efectuó una PCR con un cebador que contenía codones degenerados en las posiciones 359, 360 y 361 (numeración de la UE (cebador Abmut, gaaccacaggtgtacacccctgccccatcccggtatgagctggnnnbnn- nbcaggtcagcctgacctgcc tggtaaag, SEC ID N° 26), o, como alternativa, se efectuó una PCR con un cebador que contenía codones degenerados en las posiciones 358, 359, 360.361 y 362 (numeración de la UE (cebador Abmut2LR, gaaccacaggtgtacacccctgccccatcccggtatgaggnnnbnnbnnbgtcagcctgacctgctgtca aag, SEC ID N° 27).

El segundo cebador usado en estas PCR es gapfcs3 en ambos casos. Con el fin de crear secuencias flanqueantes para una reparación de huecos eficiente en levaduras, los productos de la PCR resultantes se amplificaron adicionalmente con el par de cebadores gapch35 y gapfsc3 y después se transformaron en la cepa EBY100 de *Saccharomyces cerevisiae* mediante transformación con acetato de litio junto con pYD1CH12 digerido con Chol como se ha descrito en lo que antecede. Como cebadores alternativos, para la aleatorización de los residuos descritos en el bucle AB, los cebadores tales como Abmut1L (gaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgaggnbnnbnnbnnbcaggt-cagcctgacctgcctgtgca aag, SEC ID N° 28) o Abmut1R (gaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccggtgagctgnbnnbnnbnnb-nbgtcagcctgacctgcctgtgca aag, SEC ID N° 29) también se usaron. De forma análoga, los residuos en el bucle EF se aleatorizaron mediante aleatorización total.

Como alternativa, la aleatorización se realizó usando oligonucleótidos enriquecidos como cebadores sobre el clon individual y- Her.C2.P4.2-9. En este caso, los oligos se diseñaron de un modo similar a lo mencionado anteriormente para la aleatorización completa de los respectivos bucles. no obstante, la parte aleatorizada contenía 70 % de la base original en la primera y segunda posición del codón y 10 % de cada uno de los otros 3 nucleótidos. La tercera posición contenía un 70 % de la base original y 30 % de la base de acuerdo con el codón NNK y NNS.

El cebador Abmut tuvo como resultado 8.000 nuevas variantes (Conjunto 2.3) de cada clon y el cebador Abmut2LR conducen a 3x10⁶ nuevas variantes (Conjunto 2.4) tras la aleatorización completa. Por tanto, los conjuntos 2.3 y 2.4 tuvieron como resultado nuevas bibliotecas de aproximadamente 10⁸ individuos, ya que el material de partida (Conjunto 2.1 +2.2) ya contenía aproximadamente 10-1.000 clones.

Tercera ronda de selección

En los conjuntos de afinidad madurada 2.3 y 2.4 y, en caso necesario, el conjunto 2.1(solo se prefieren las células positivas a Prot A) se indujo la expresión de Fcab en su superficie celular como se ha descrito en lo que antecede y, después, se clasifican como se ha descrito para la "Segunda ronda de selección". con la excepción de que los conjuntos 2.3 y 2.4 son mucho más grandes y, por tanto, los volúmenes de tinción para los conjuntos son iguales a los de la tinción de las bibliotecas descrita en la "Primera ronda de selección". En la tercera ronda de selección, solo las células positivas para Her2/positivas para Prot A se clasificaron. Los conjuntos derivados de estas selecciones contenían normalmente > 20 % de células positivas para Her2/para Prot A. En caso contrario, se realizaron una cuarta y una quinta ronda de selección (o incluso más) de Her2 junto con o también sin proteína A. Por ejemplo, la maduración de la afinidad del clon H242-9Q dio un incremento en la afinidad de unión de CE50= 155nM a 18,9 nM (clon H10-03-6 clone)

Análisis de los clones:

Los clones individuales de los conjuntos que contienen las células Her2/Prot (se prefiere >20 %) se prepararon sembrando los conjuntos en placas de agar con medio SD-CAAo mediante transferencia de las células únicas (=clones) directamente desde el FACS ARIA a placas sin generar un conjunto. Se dejan cultivar los clones y se transfieren a cultivos líquidos y se almacenan a -80°C. Los alícuotas de los clones se indujeron después para expresar Fcab sobre su superficie celular como se ha descrito en lo que antecede y se someten a detección selectiva para una serie de parámetros en el FACS. Estos parámetros fueron: un intervalo de respuesta a la dosis del antígeno usado para la selección (Her2) con y sin la presencia de Prot A- FITC. Tinción de CD64 como se ha descrito en lo que antecede. Además, el uso de protocolos de tinción similares se realizó la detección selectiva de una serie de antígenos biotinilados irrelevantes para identificar los Fcab sin reacciones cruzadas.

Se observó que, tras varias rondas de selección de células positivas para antígeno (Her2) + Prot A, un gran porcentaje de clones muestran > 25 % de positividad al antígeno (Her2) cuando se tiñen con el antígeno (Her2) 500 nM y > 70 % de positividad a la proteína A cuando se tiñen con 2 ug/ml de Prot A-FITC. En la mayoría de los casos, estos clones también mostraron > 50 % de unión a CD64. Por tanto, esto refleja los niveles de tinción con Prot A y CD64 de los fragmentos Fc no aleatorizados (Fcab wt) expresados en levaduras.

Los clones seleccionados como se ha descrito en lo que antecede con características como se ha descrito en lo que antecede se produjeron como moléculas solubles. Esto se realizó principalmente mediante transfección transitoria, pero también mediante transfección estable del ADN de Fcab en las nuevas células huésped. Con este fin, el ADN de clones de levaduras individuales se aisló usando procedimientos estándar. El ADN de codificación relevante para el dominio CH3 completo O sólo la parte del dominio CH3 que se asignó al azar en la biblioteca se amplificó mediante PCR y se transfirió a un vector de expresión nuevo que contiene la parte que falta de la Fcab y un promotor adecuado y uno de más marcadores de selección, tales como G418, lo que permite la selección de células transfectadas de un conjunto de células no transfectadas. El nuevo vector se transfectó después transitoriamente en una nueva célula huésped, tales como células HEK293 o CHO. Se dejó que las células huésped se recuperaran y se cultivaron posteriormente durante un máximo de 10 días. El sobrenadante de los cultivos que contiene el Fcab soluble se utilizó para su análisis adicional después de la purificación sobre Prot A. Las líneas celulares estables también se pueden realizar por procedimientos estándar.

Tabla 4: Secuencias de clones de levaduras de unión a Her2 seleccionados de bibliotecas iniciales, tras la expansión del conjunto y tras la maduración de la afinidad: con referencia a la numeración de la SEC ID N° 1 (Figura) (bucle CD); AA169ff NGQPE)

Nombre del clon	Bucle AB AA143ff	Bucle EF AA198ff
Fcab wt	LTKNQ	DKSRWQQ
y-Her.C2-P3.1-1	LDNSQ (SEC ID N° 30)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
y-Her.C2-P3.1-3	YEGSS (SEC ID N° 31)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
y-Her.C2-P3.1-5	YMSAD (SEC ID N° 32)	SRRDSSLRWAH (SEC ID N° 53)
y-Her.C2-P3.1-6	YRRGD (SEC ID N° 33)	APGSKGYRRWAL (SEC ID N° 54)
y-Her.C2-P3.1-8	LMSRQ (SEC ID N° 34)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
y-Her.C2-P3.1-16	LHLAQ (SEC ID N° 35)	SINDLINHRWPY (SEC ID N° 56)
y-Her.C2-P3.1-18	YLSKD (SEC ID N° 36)	MWGSRDYWRWSH (SEC ID N° 57)
y-Her.C2-P3.2-3	YRSGS (SEC ID N° 37)	NSGSAMMVRWAH (SEC ID N° 58)
y-Her.C2-P3.2-9	LRDGQ (SEC ID N° 38)	QRSRLSRQRWWR (SEC ID N° 59)
y-Her.C2.P4.2-1	YSANT (SEC ID N° 39)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-3	YASNT (SEC ID N° 40)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-4	YSDGD (SEC ID N° 41)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-5	YSGGS (SEC ID N° 42)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-6	YGRDS (SEC ID N° 43)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-8	YAGGT (SEC ID N° 44)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-10	YSSDS (SEC ID N° 45)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-12	YHSGS (SEC ID N° 46)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-15	YLTNS (SEC ID N° 47)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-18	YGSEE (SEC ID N° 48)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-19	YRSGE (SEC ID N° 49)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-20	YGTDD (SEC ID N° 50)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-9	YLHGD (SEC ID N° 161)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
HAF1311A1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRYSMTMWRWAH (SEC ID N° 61)
HAF1311A10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSRSMWRWAH (SEC ID N° 62)
HAF1311A11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQMMWRWAH (SEC ID N° 63)
HAF1311A12	YLHGD (SEC ID N° 161)	ITRYSRQMLRWAH (SEC ID N° 64)
HAF1311A2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSALMWRWAH (SEC ID N° 65)
HAF1311A3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSEAMWKWGH (SEC ID N° 66)
HAF1311A4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 67)
HAF1311A5	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
HAF1311A6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRHSPTMWKWAH (SEC ID N° 69)
HAF1311A7	YLHGD (SEC ID N° 161)	LGRWSPKMWRWAH (SEC ID N° 70)
HAF1311A8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMWRWAH (SEC ID N° 71)
HAF1311A9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSPSMWRWAH (SEC ID N° 83)
HAF1311B1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMWRWAH (SEC ID N° 84)
HAF1311B10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARKNHRKWRTH (SEC ID N° 85)
HAF1311B11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRYSPTMWQWAH (SEC ID N° 86)
HAF1311B12	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1311 B2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSQTMWRWAH (SEC ID N° 88)
HAF1311 B3	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRFSPSMWRWAH (SEC ID N° 89)
HAF1311B4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRYSQSMWRWAH (SEC ID N° 90)
HAF1311B5	YLHGD (SEC ID N° 161)	IERYSTRMWSWAH (SEC ID N° 91)
HAF1311B6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPMWHWAH (SEC ID N° 92)
HAF1311B7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARGSPSMWSWGH (SEC ID N° 93)
HAF1311B8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSQTMWHWAH (SEC ID N° 94)
HAF1311B9	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARYSPGMWRWAH (SEC ID N° 95)
HAF1311C1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRFSPTMWKWAH (SEC ID N° 96)
HAF1311C10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRWSRTMLRWAH (SEC ID N° 97)

HAF1311C11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSPRMWRWAH (SEC ID N° 98)
HAF1311C2	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARHSKSMWSWAH (SEC ID N° 99)
HAF13112C3	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRWKSLSGWAH (SEC ID N° 100)
HAF1311C5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYTPSMWRWAH (SEC ID N° 101)
HAF1311C7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSLTMWRWAH (SEC ID N° 102)
HAF1311C8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWKWAH (SEC ID N° 103)
HAF1311C9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1311D2	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSLSRWAH (SEC ID N° 105)
HAF1311D3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)
HAF1311D4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRSSLTMWKWAH (SEC ID N° 107)
HAF1311D5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSTRMWKWAH (SEC ID N° 108)
HAF1311D6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 109)
HAF1311D7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRYSPSMWRWAH (SEC ID N° 110)
HAF1311E10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 109)
HAF1311 E2	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRWKSLSGWAH (SEC ID N° 100)
HAF1311 E3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRHSSSMWRWAH (SEC ID N° 111)
HAF1311 E4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSRSMKKWAH (SEC ID N° 112)
HAF1311 E5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARGSTTMWRWGH (SEC ID N° 113)
HAF1311E6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPEMWRWAH (SEC ID N° 114)
HAF1311E7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSTGMWNWAH (SEC ID N° 115)
HAF1311 E8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 116)
HAF1311 E9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRNSPRMWRWAH (SEC ID N° 117)
HAF1312F1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMSRWAH (SEC ID N° 118)
HAF1312G12	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMKSWAH (SEC ID N° 119)
HAF1312F11	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRYSTKMKRWAH (SEC ID N° 120)
HAF1312F7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
HAF1312F3	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
HAF1312F5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRWTPSMWRWAH (SEC ID N° 123)
HAF1312G10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VKRSSPSMWRWAH (SEC ID N° 124)
HAF1312G2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1312G1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARYSPGMWNWAH (SEC ID N° 125)
HAF1312G9	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPNMWNWAH (SEC ID N° 126)
HAF1312G8	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1312F12	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMLKWAH (SEC ID N° 128)
HAF1312F2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSKSMLKWAH (SEC ID N° 129)
HAF1312F10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSRTMWRWGH (SEC ID N° 130)
HAF1312G7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARHSREMLRWAH (SEC ID N° 131)
HAF1312F8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSSTMSRWAH (SEC ID N° 132)
HAF1321A1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 116)
HAF1321B11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQMMWRWAH (SEC ID N° 63)
HAF1321A2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSPRMWRWAH (SEC ID N° 98)
HAF1321A10	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
HAF1321A4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSLKKLQRKH (SEC ID N° 133)
HAF1321 B10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1321A5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWNWAH (SEC ID N° 134)
HAF1321B1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPTMWKWAH (SEC ID N° 148)
HAF1321A11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1321B5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRFSPSMWRWAH (SEC ID N° 149)
HAF1321B2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRWTPSMWRWAH (SEC ID N° 123)
HAF1321B6	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1321B7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1321B9	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRYTPSMWRWAH (SEC ID N° 150)
HAF1322C10	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)

HAF1322C11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSTLMWRWAH (SEC ID N° 151)
HAF1322C7	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 152)
HAF1322C6	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMLRWAH (SEC ID N° 153)
HAF1322C3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1322C4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPAMWRWAH (SEC ID N° 154)
HAF1322C8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPSMWRWAH (SEC ID N° 147)
H10-03-6	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRHSARMWRWAH (SEC ID N° 155)
H10-03-6R	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRHSARMWRWAH (SEC ID N° 155)
H10-03-6Y	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRYSARMWRWAH (SEC ID N° 156)
ABEFs0101	YLSAD (SEC ID N° 163)	VARYSPSMWRWGH (SEC ID N° 135)
ABS0101G	YLSAD (SEC ID N° 163)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)
ABS0101P	YLSAD (SEC ID N° 163)	VPRYSASMWRWGH (SEC ID N° 136)
ABS0101PG	YLSAD (SEC ID N° 163)	VPRYSASMWRWAH (SEC ID N° 137)
EF3-1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRYSPGMWRWAH (SEC ID N° 138)
EF3-2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWNWAH (SEC ID N° 134)
EF3-3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWGH (SEC ID N° 135)
EF3-4	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
EF3-6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSQTMSRWAH (SEC ID N° 139)
EF3-7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
EF3-8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VAGYRPRRSGSSH (SEC ID N° 140)
EF3-9	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARHSANMLRWAH (SEC ID N° 141)
EF3-13	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPSMWSWAH (SEC ID N° 142)
EF3-14	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYTPSMWRWAH (SEC ID N° 101)
EF3-15	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMFRWAH (SEC ID N° 143)
EF3-16	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMKSWAH (SEC ID N° 119)
EF3-17	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSRTMWRWGH (SEC ID N° 130)
EF3-18	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMSRWAH (SEC ID N° 118)
EF3-20	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMLRWAH (SEC ID N° 144)
EF10-01	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPTMWRWAH (SEC ID N° 145)
EF10-02	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)
E-F10-03	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMMRWAH (SEC ID N° 71)
EF10-04	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRWSPTMWRWAH (SEC ID N° 146)
EF10-07	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSPSMWRWAH (SEC ID N° 83)
EF10-08	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSLSRWAH (SEC ID N° 105)
EF10-09	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPSMWRWAH (SEC ID N° 147)
EF10-10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPRMWRWAH (SEC ID N° 157)
EF10-13	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSRKMSSWGH (SEC ID N° 158)
EF10-14	YLHGD (SEC ID N° 161)	LASYSPSMWRWGH (SEC ID N° 159)
EF10-15	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)

Tabla 5: Secuencias de clones de levaduras de unión a Her2 seleccionados de bibliotecas iniciales, tras la expansión del conjunto y tras la maduración de la afinidad: con referencia a la numeración de la SEC ID N° 1 (Figura 3)

Nombre del clon	Bucle AB AA143ff	Bucle CD AA169ff	Bucle EF AA198ff
H542-M3C8	LSLPC (SEC ID N° 164)	ISGPE (SEC ID N° 240)	PQTPPSQ (SEC ID N° 340)
H541-M2D7	REGGR (SEC ID N° 165)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
H541-M2E11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	DGRPE (SEC ID N° 242)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
H541-M2D12	TKAFY (SEC ID N° 167)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H541-M2H10	TKGL_ (SEC ID N° 172)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H541-M2H8	TKAFY (SEC ID N° 167)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H542-M3A10	WWLFG (SEC ID N° 168)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3F10	IKKKK (SEC ID N° 169)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H542-M3D5	KWNKK (SEC ID N° 170)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRSRWRG (SEC ID N° 344)

H542-M4A4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRWKM (SEC ID N° 345)
H542-M3G11	YKTKD (SEQ ID No-173)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRYNPRMVRWAH (SEC ID N° 346)
H542-M3D9	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQSRWYN (SEC ID N° 347)
H542-M3F7	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H542-M4B12	RKEKK (SEC ID N° 174)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H542-M3D11	WWVGG (SEC ID N° 175)	DAGPE (SEC ID N° 243)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3A4	WWRGG (SEC ID N° 176)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWLQ (SEC ID N° 350)
H542-M3B8	WWRGG (SEC ID N° 176)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3C4	YGHKY (SEC ID N° 177)	NKQNH (SEC ID N° 244)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H542-M4D4	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEC ID N° 351)
H542-M3A7	TGGNK (SEC ID N° 179)	NMGPE (SEC ID N° 245)	NRSRWQQ (SEC ID N° 352)
H542-M3C12	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H542-M3E10	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKQLKK (SEC ID N° 354)
H542-M3E6	LDGDQ (SEC ID N° 180)	NGQPE (SEC ID N° 241)	QKKRKKKKK (SEC ID N° 355)
H542-M4E9	FIPHN (SEC ID N° 181)	DCGPE (SEC ID N° 246)	PPPLCAP (SEC ID N° 356)
H542-M4D8	KKKGK (SEC ID N° 182)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SLNRWKR (SEC ID N° 357)
H542-M4H8	KKKGK (SEC ID N° 182)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SLNRWKR (SEC ID N° 357)
H542-M4B11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KNKKKRK (SEC ID N° 358)
H542-M4C10	LTKNQ (SEC ID N° 166)	MDGPE (SEC ID N° 247)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H542-M4F11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKMKK (SEC ID N° 360)
H542-M4C8	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H542-M4G2	KNKKK (SEC ID N° 183)	NGQPE (SEC ID N° 241)	REREWK (SEC ID N° 362)
H542-M4C7	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEQ ID No-351)
H561G3M1B8	KKKNN (SEC ID N° 184)	YPEKH (SEC ID N° 248)	DKSRWQQ (SEC ID N° 363)
H542-M4D10	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEC ID N° 351)
H542-M4B3	KKKKR (SEC ID N° 185)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PLRLPPM (SEC ID N° 364)
H542-M4A6	YGHKY (SEC ID N° 177)	NKQNH (SEC ID N° 244)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H561G3M1C6	LKKKT (SEC ID N° 186)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRSNWYGNRWR (SEC ID N° 365)
H542-M4C1	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQSRWYN (SEC ID N° 347)
H542-M4F4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H561G3M1E1	TKGRW (SEC ID N° 187)	NGAPQ (SEC ID N° 249)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H542-M4F6	LSLPC (SEC ID N° 164)	ISGPE (SEC ID N° 240)	PQTPPSQ (SEC ID N° 340)
H561G3M1A1	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TPGNLAL (SEC ID N° 366)
H561G3M1A10	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SREDFRA (SEC ID N° 367)
H561G3M1A9	KHAET (SEC ID N° 189)	NGQPE (SEC ID N° 241)	LVISVSG (SEC ID N° 368)
H561G3M1B10	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H561G3M1G4	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H561G3M1B9	EGKRK (SEC ID N° 192)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1C1	RHGGW (SEC ID N° 193)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DLQDKKY (SEC ID N° 371)
H561G3M1C2	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ISVPPDE (SEC ID N° 372)
H561G3M1H8	-KSGY (SEC ID N° 194)	RKKKE (SEC ID N° 251)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1C8	AKEGG (SEC ID N° 195)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TGPDITV (SEC ID N° 373)
H561G3M1D1	KYWMA (SEC ID N° 196)	NGQPE (SEC ID N° 241)	IVLSGFR (SEC ID N° 374)
H561G3M1D5	KKKNK (SEC ID N° 188)	DAGPE (SEC ID N° 243)	MGIHNIN (SEC ID N° 375)
H564G11M2F4	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	MKQDEMA (SEC ID N° 376)
H561G3M1E2	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H561G3M1E6	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQWRLQW (SEC ID N° 377)
H561G3M1E7	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	HRRLVAR (SEC ID N° 378)
H561G3M1F10	QLRNK (SEC ID N° 197)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KQNLRRK (SEC ID N° 379)
H561G3M1F2	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1G1	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	S RARWRH (SEC ID N° 343)

H564G11M2F12	KNHNT (SEC ID N° 199)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRSRLHGNRWRR (SEC ID N° 380)
H561G3M1H3	KKKKK (SEC ID N° 171)	GNWQP (SEC ID N° 253)	NRERWRR (SEC ID N° 381)
H561G3M1H7	MSENE (SEC ID N° 200)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TWVRWMQ (SEC ID N° 382)
H564G11M2G2	KKKNK (SEC ID N° 188)	TTGPY (SEC ID N° 254)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H564G11M2A10	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PHWQWKW (SEC ID N° 383)
H564G11M2A4	YGHKY (SEC ID N° 177)	DMNQP (SEC ID N° 255)	SKKKLRK (SEC ID N° 384)
H564G11M2A5	YGHKY (SEC ID N° 177)	KWPMF (SEC ID N° 256)	PWKRLRK (SEC ID N° 385)
H564G11M2A9	WWMDY (SEC ID N° 201)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2B1	YGHKY (SEC ID N° 177)	HDQRH (SEC ID N° 257)	TQKRWRS (SEC ID N° 386)
H564G11M2B12	MKKNK (SEC ID N° 202)	LGMYM (SEC ID N° 258)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2B3	YGHKY (SEC ID N° 177)	N KM FT (SEC ID N° 259)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H564G11M2B4	EYFRH (SEC ID N° 203)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TRRRWTR (SEC ID N° 388)
H564G11M2B5	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DHRRINR (SEC ID N° 389)
H564G11M2B7	FDMRD (SEC ID N° 204)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2C1	MKKPY (SEC ID N° 205)	LGYPE (SEC ID N° 260)	KKKKYHK (SEC ID N° 390)
H564G11M2C11	KKKNN (SEC ID N° 184)	HGYQL (SEC ID N° 261)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H564G11M2C3	YGHKY (SEC ID N° 177)	NVFIE (SEC ID N° 262)	QKKKLKK (SEC ID N° 391)
H564G11M2C7	FEMPY (SEC ID N° 206)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2C9	YGHKY (SEC ID N° 177)	NRGWH (SEC ID N° 263)	PQKKLRK (SEC ID N° 392)
H564G11M2D1	KKKNH (SEC ID N° 207)	PFTLK (SEC ID N° 264)	DKRGIRK (SEC ID N° 393)
H564G11M2D10	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H564G11M2D4	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H564G11M2D9	YGHKY (SEC ID N° 177)	STTRV (SEC ID N° 265)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2E10	KKKNH (SEC ID N° 207)	WDQHQ (SEC ID N° 266)	EKKRWKE (SEC ID N° 394)
H564G11M2E11	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	TSRRWRE (SEC ID N° 395)
H564G11M2E3	YGHKY (SEC ID N° 177)	SGWMM (SEC ID N° 267)	KKEKLK (SEC ID N° 396)
H564G11M2E8	YGHKY (SEC ID N° 177)	WRKMT (SEC ID N° 268)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2H10	YGHKY (SEC ID N° 177)	FPKKY (SEC ID N° 269)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2F2	MWEPS (SEC ID N° 208)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H564G11M2F5	LRGST (SEC ID N° 209)	SPYFV (SEC ID N° 270)	KKKKIMK (SEC ID N° 398)
H564G11M2F6	KKKKK (SEC ID N° 171)	I RGTS (SEC ID N° 271)	DQTRWRR (SEC ID N° 399)
H564G11M2F7	DSYMI (SEC ID N° 210)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TWVRWMQ (SEC ID N° 382)
H564G11M2F9	YGHKY (SEC ID N° 177)	QVPGW (SEC ID N° 272)	KKKEIKK (SEC ID N° 400)
H564G11M2G4	YGHKY (SEC ID N° 177)	DLPYQ (SEC ID N° 273)	KKNKLKK (SEC ID N° 401)
H564G11M2G6	YGHKY (SEC ID N° 177)	PRSHW (SEC ID N° 274)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2G7	KKKNK (SEC ID N° 188)	LYGHA (SEC ID N° 275)	NRERWRR (SEC ID N° 381)
H564G11M2G9	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWWQFRQ (SEC ID N° 402)
H564G11M2H2	YGHKY (SEC ID N° 177)	APYVH (SEC ID N° 276)	KKKEIKK (SEC ID N° 400)
H564G11M2H3	MEQHS (SEC ID N° 211)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2H4	YGHKY (SEC ID N° 177)	RTGQK (SEC ID N° 277)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2H8	YGHKY (SEC ID N° 177)	PTYWY (SEC ID N° 278)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H564G11M2H9	KKKKH (SEC ID N° 212)	EGMEI (SEC ID N° 279)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H565_G12C1	LKKKT (SEC ID N° 186)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRSNWYGNRWRR (SEC ID N° 365)
H565_G12D5	KKKKK (SEC ID N° 171)	PVVGA (SEC ID N° 280)	DQSKLSSLRWKK (SEC ID N° 403)
H565_G12E4	KKKKK (SEC ID N° 171)	PLMVD (SEC ID N° 281)	DQSKLSSLRWKK (SEC ID N° 403)
H565_G12A1	KKKNH (SEC ID N° 207)	KYGSQ (SEC ID N° 282)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C4	KKKNH (SEC ID N° 207)	RWNNQ (SEC ID N° 283)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12F1	KKKNH (SEC ID N° 207)	VYKQD (SEC ID N° 284)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A10	KKKNH (SEC ID N° 207)	NQMKF (SEC ID N° 285)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A8	KKKNH (SEC ID N° 207)	NHQHT (SEC ID N° 286)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)

H565_G12A4	KKKNH (SEC ID N° 207)	KRFVD (SEC ID N° 287)	PNEKLKK (SEC ID N° 404)
H565_G12B2	KKKNH (SEC ID N° 207)	HHEPL (SEC ID N° 288)	PLSRWKR (SEC ID N° 405)
H565_G12F4	KKKNH (SEC ID N° 207)	PKMPY (SEC ID N° 289)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H565_G12H5	KKKNH (SEC ID N° 207)	PKDHE (SEC ID N° 290)	ARSRWRK (SEC ID N° 408)
H565_G12G6	LTKNQ (SEC ID N° 166)	AKGSI (SEC ID N° 291)	PKKRLRR (SEC ID N° 409)
H565_G12A5	YGHKY (SEC ID N° 177)	EDPEM (SEC ID N° 292)	KNKKRKK (SEC ID N° 410)
H565_G12E9	YGHKY (SEC ID N° 177)	EFDHQ (SEC ID N° 293)	KNKKRKK (SEC ID N° 410)
H565_G12F8	YGHKY (SEC ID N° 177)	NEKQD (SEC ID N° 294)	NTKKLKK (SEC ID N° 411)
H565_G12D2	YGHKY (SEC ID N° 177)	APHYY (SEC ID N° 295)	NRKRIRK (SEC ID N° 412)
H565_G12F7	YGHKY (SEC ID N° 177)	PQLHL (SEC ID N° 296)	SRKRFRS (SEC ID N° 413)
H565_G12G2	YGHKY (SEC ID N° 177)	NWRAE (SEC ID N° 297)	ARSRWRK (SEC ID N° 408)
H565_G12H11	YGHKY (SEC ID N° 177)	NNQYK (SEC ID N° 298)	PFRRWVK (SEC ID N° 414)
H565_G12A7	YGHKY (SEC ID N° 177)	-RSIH (SEC ID N° 299)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A9	YGHKY (SEC ID N° 177)	RDRIM (SEC ID N° 300)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B3	YGHKY (SEC ID N° 177)	YGKGH (SEC ID N° 301)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B5	YGHKY (SEC ID N° 177)	GKGGK (SEC ID N° 302)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E3	YGHKY (SEC ID N° 177)	RHIGK (SEC ID N° 303)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E12	YGHKY (SEC ID N° 177)	QYTYH (SEC ID N° 304)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B1	YGHKY (SEC ID N° 177)	LHSHV (SEC ID N° 305)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B11	YGHKY (SEC ID N° 177)	STTRV (SEC ID N° 265)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12D1	YGHKY (SEC ID N° 177)	ARDKR (SEC ID N° 306)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E2	YGHKY (SEC ID N° 177)	EHKKT (SEC ID N° 307)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C5	KKKKK (SEC ID N° 171)	MDEVP (SEC ID N° 308)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C7	-KKKK (SEC ID N° 190)	QDWQR (SEC ID N° 309)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12G1	-KKKK (SEC ID N° 190)	PSDRE (SEC ID N° 310)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12G8	NKKKK (SEC ID N° 213)	QNTRW (SEC ID N° 311)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C9	-KKKK (SEC ID N° 190)	DEGLH (SEC ID N° 312)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A11	IMNDW (SEC ID N° 214)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12D10	WTNGD (SEC ID N° 215)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12F6	WWHDM (SEC ID N° 216)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12B4	WENPH (SEC ID N° 217)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12H2	LYHEH (SEC ID N° 218)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12H8	GGDQH (SEC ID N° 219)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12C12	IYVPY (SEC ID N° 220)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12G10	FEMPY (SEC ID N° 206)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12C2	VVTSQ (SEC ID N° 221)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12B6	WWNSK (SEC ID N° 222)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKQLKK (SEC ID N° 354)
H565_G12A12	MTGPG (SEC ID N° 223)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12D7	MWEPS (SEC ID N° 208)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12F3	DTYHD (SEC ID N° 224)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12F5	QDEKT (SEC ID N° 225)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12B12	GDHRI (SEC ID N° 226)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H565_G12D8	RNSNS (SEC ID N° 227)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H565_G12D9	RENTM (SEC ID N° 228)	NGQPE (SEC ID N° 241)	NKKKKKK (SEC ID N° 415)
H565_G12H9	VNDKM (SEC ID N° 229)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SKKKLRK (SEC ID N° 384)
H565_G12E1	RKKDE (SEC ID N° 230)	WPNME (SEC ID N° 313)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12E8	SNSGY (SEC ID N° 231)	MDGPE (SEC ID N° 247)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12G7	FEYRH (SEC ID N° 232)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PKKRLRR (SEC ID N° 409)
H565_G12E5	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H565_G12A2	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	NGKRLHS (SEC ID N° 416)
H565_G12C8	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PKWLWHQ (SEC ID N° 417)
H565_G12E7	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWWKHHV (SEC ID N° 418)
H565_G12F12	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PNWKYQW (SEC ID N° 419)

H565_G12F10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQRKVAP (SEC ID N° 420)
H565_G12G9	RKKKK (SEC ID N° 233)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWYKVLN (SEC ID N° 421)
H565_G12H10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRKWWTF (SEC ID N° 422)
H565_G12A3	KKKKK (SEC ID N° 171)	MTGRV (SEC ID N° 314)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12B8	KKKKK (SEC ID N° 171)	GKYNL (SEC ID N° 315)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12H4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NAYLL (SEC ID N° 316)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12C10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12C6	KKKKK (SEC ID N° 171)	AQYNV (SEC ID N° 317)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12G11	KKKKK (SEC ID N° 171)	LYGHA (SEC ID N° 275)	NRERWRR (SEC ID N° 381)
H565_G12G5	KKKKK (SEC ID N° 171)	LYGHA (SEC ID N° 275)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12A6	KKKKK (SEC ID N° 171)	NQVMT (SEC ID N° 318)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H565_G12E6	KKKKK (SEC ID N° 171)	VVHDT (SEC ID N° 319)	PRHEWVM (SEC ID N° 423)
H565_G12B10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NIWHQ (SEC ID N° 320)	DKSRWQQ (SEC ID N° 363)
H565_G12H6	KKKKK (SEC ID N° 171)	QWGNM (SEC ID N° 321)	DKSRWQQ (SEC ID N° 363)
H565_G12D12	KKKKK (SEC ID N° 171)	MHVKS (SEC ID N° 322)	PWSRWMQ (SEC ID N° 424)
H565_G12B9	-KKKK (SEC ID N° 190)	EYTVV (SEC ID N° 323)	PLSRWKR (SEC ID N° 405)
H565_G12E11	-KKKK (SEC ID N° 190)	GPYQD (SEC ID N° 324)	PLSRWKR (SEC ID N° 405)
H565_G12F9	KKKKK (SEC ID N° 171)	QGVLE (SEC ID N° 325)	TQNQIKK (SEC ID N° 406)
H571A1	KKKKK (SEC ID N° 171)	LYGHA (SEC ID N° 275)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571C10	KKKKK (SEC ID N° 171)	QQPGV (SEC ID N° 326)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571E6	KKKKK (SEC ID N° 171)	NQVRG (SEC ID N° 327)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571D10	KKKKK (SEC ID N° 171)	VPHVL (SEC ID N° 328)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571 D4	KKKKK (SEC ID N° 171)	DGRKQ (SEC ID N° 329)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571C3	KKKKK (SEC ID N° 171)	NASFE (SEC ID N° 330)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H571A3	LTKNQ (SEC ID N° 166)	KKRVV (SEC ID N° 331)	SRARWLH (SEC ID N° 425)
H571D7	YGHKY (SEC ID N° 177)	KGIKK (SEC ID N° 332)	SRARWLH (SEC ID N° 425)
H571B1	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	SRARWLH (SEC ID N° 425)
H571B9	TKGRW (SEC ID N° 187)	NGAPQ (SEC ID N° 249)	SRARWLH (SEC ID N° 425)
H571E5	EGKRK (SEC ID N° 192)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRARWLH (SEC ID N° 425)
H571A5	YGHKY (SEC ID N° 177)	YRRGD (SEC ID N° 33)	PKKRLRR (SEC ID N° 409)
H571A9	YGHKY (SEC ID N° 177)	PMGKY (SEC ID N° 334)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571C9	YGHKY (SEC ID N° 177)	FPKKY (SEC ID N° 269)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571B3	YGHKY (SEC ID N° 177)	RHIGK (SEC ID N° 303)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571D9	YGNSY (SEC ID N° 234)	RGIKK (SEC ID N° 335)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571C2	KKKNK (SEC ID N° 188)	LWGGM (SEC ID N° 336)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571C5	KKKNH (SEC ID N° 207)	NAHYI (SEC ID N° 337)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H571B11	RNRKK (SEC ID N° 235)	SGTRL (SEC ID N° 338)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H571A6	WDHGS (SEC ID N° 236)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H571F3	FAKRT (SEC ID N° 237)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H571E12	SMDKV (SEC ID N° 238)	YRRGD (SEC ID N° 33)	DKSRWQQ (SEC ID N° 363)
H571A7	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H571D12	EYFRH (SEC ID N° 203)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TRRRWTR (SEC ID N° 388)
H571D6	RHQDR (SEC ID N° 239)	NGQPE (SEC ID N° 241)	NRSRLHGNRWRR (SEC ID N° 426)
H571A2	LKKKT (SEC ID N° 186)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRSNWYGNRWRR (SEC ID N° 365)

Expresión y purificación de clones específicos de antígeno en células de mamíferos:

- 5 Clones seleccionados como se ha descrito en lo que antecede con características como se ha descrito en lo que antecede se clonan en un vector de expresión en mamíferos tales como pCEP4 (Invitrogen). ADN plasmídico altamente purificado (Qiagen) se usó para transfectar transitoriamente células libres HEK293 con reactivo Freestyle™ MAX según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). El día 5 después de la transfección, los sobrenadantes se limpian de residuos celulares mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,2µM Stericup (Millipore). Como alternativa, las células libres HEK293 o células CHO con plásmidos de expresión que contienen genes para la

resistencia a antibióticos, tales como neomicina o puomicina. Las células transfectadas se cultivan en presencia de los antibióticos dando lugar a una supervivencia específica de clones de células que expresan de forma estable el gen de resistencia a antibióticos junto con el fragmento Fc específico de antígeno. Estos transfectantes estables segregan constantemente la proteína de interés durante períodos de tiempo largos. Los Fcab específicas de antígeno se purificaron a partir de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de inmunoafinidad de la proteína A. Las Fcab unidas se eluyen de la proteína A lavando la columna con tampón glicina (pH=2,9-4,0), seguido de diálisis frente a PBS (pH = 6,8). La pureza de los Fcab se determina mediante análisis de SDS-PAGE no reductor y los potenciales agregados se detectan mediante HPLC de exclusión por tamaño usando una columna Zorbax GF250 y PBS como tampón de carrera.

Caracterización estructural de Fcab:

La unión a receptores Fc y la proteína A se utilizó para estimar la integridad estructural global de las Fcab purificados. La asociación con el receptor neonatal de Fc (FcRn) se midió mediante la adición de 10 µg/ml Fcab a un chip de Biacore CM5 acoplado a 5.000 unidades de respuesta (UR) del FcRn humano recombinante a pH = 6,0. La disociación de Fcab del FcRn se analizó a pH = 7,4. Estos experimentos demostraron una interacción dependiente del pH de los Fcab específicos de Her2 con FcRn con características de unión muy similares a las del Fcab silvestre. La unión de Fcab al receptor CD64 de Fc de alta afinidad se midió utilizando un chip de Biacore CM5 revestido con 3000 UR de Proteína A, s seguido de la adición de una solución Fcab 10 µg/ml. Finalmente, se añadió CD64 soluble humana en 5 µg/ml. Las curvas de unión resultantes eran indistinguibles de las obtenidos con el Fcab tipo silvestre. La interacción de Fcab recombinantes (10 µg/ml) con Proteína A también se midió mediante SPR usando una chip de Biacore CM5 recubierto con proteína A (3.000 UR). De nuevo, las afinidades eran salvajes comparables a las obtenidas con el Fcab silvestre.

Unión específica de antígeno para Fcab:

La potencia y especificidad de los Fcab específicos de Her2 para unirse a Her-2 se evaluó por ELISA. El Her-2 humano soluble (Bender Med Systems, Austria) se recubrió con plástico a 2 µg/ml. Después de lavar y bloquear los sitios de unión no específica, se añadieron concentraciones crecientes de Fcab. Para detectar los Fcab unidos a Her2 se añadieron anticuerpos monoclonales específicos del dominio CH2 que se conjugaron con peroxidasa de rábano (Serotec). Los resultados demuestran que algunos Fcab específicos de Ger2 podían interaccionar con su diana en el límite bajo nanomolar (Tabla 6). Esta interacción fue específica, ya que la unión a otros miembros de la familia Her (Her1, Her3 y Her4) fue >100 veces más débil según el ELISA. No se detectó unión a antígenos Her2 no relacionados.

Tabla 6: Afinidades de unión de Fcab específicos de Her2 en ELISA:

clon de Fcab	CE ₅₀ [nM] ELISA de Her 2	CE ₅₀ [nM] de unión celular SKBR3
y-Her.C2.P4.2-3	463	nr
y-Her.C2.P4.2-4	370	nr
H561G3M1G4	263	nr
y-Her.C2.P4.2-19	93	nr
ABEFs0101	16,1	5,2
H 10-03-6	4,8	10,3
EF3-17	4,7	1,3
y-Her.C2.P4.2-9	4,3	nr
H10-03-6R	2,6	11,1
nr= no realizado.		

La unión al antígeno también se determinó mediante SPR Chips Biacore CM5 se recubrieron con diferentes cantidades de Her-2 soluble humano, seguido de la adición de concentraciones crecientes de Fcab. La afinidad (K_d) de los Fcab se calculó a partir de las curvas de unión resultantes tras ajustar usando el software BiaEval. En estas condiciones experimentales, Los Fcab específicos de Her-2 H561 G3M1 G4 y H10-03-6 se unieron a Her-2 con valores de K_d de 7,55nM y 8,6nM, respectivamente. La unión a antígeno también se evaluó mediante FACAS usando líneas celulares de cáncer de mama humano que sobreexpresan Her-2 SKBR3 y Calu- 3. 1×10^5 células se incubaron con concentraciones crecientes de Fcab durante 60 minutos en hielo. Después, los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante centrifugación y lavado. Los Fcab unidos a las células se detectaron por incubación con anticuerpos específicos anti-Fc humanos conjugados con ficoeritrina (Sigma) durante 60 minutos en hielo. Después de lavar las células, se midió la intensidad de la fluorescencia en la superficie celular en un instrumento FACS Calibur (Beckton Dickinson). Todas las bandas de Fcab específicos de Ger2 se unieron a las células SKBR3 y Calu-3 pero sólo mínimamente a las células MDA-MB468 que no expresan Her-2, lo que confirma la débil reactividad cruzada observada en el ELISA. Las afinidades aparentes (CE50) de los Fcab específicos de Her2 sobre las células SKBR3 se enumeran en la Tabla 6.

Función efectora de Fcab específicos de antígeno (ADCC):

Con el fin de determinar si los Fcab específicos de Her2 median las funciones efectoras de Fc, se realizan ensayos de ADCC. En estos tipos de ensayos, los anticuerpos se unen a las células diana y se marcan para apoptosis en virtud de la unión a los receptores Fc sobre las células efectoras, tales como células asesinas naturales (NK). Las células SKBR3 (células diana) que están marcadas con el colorante fluorescente carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) se incuban con concentraciones crecientes de Fcab específicos de Her2 durante 20 minutos a 37 ° C. Las células NK sin tocar se aislaron a partir de sangre humana de donantes sanos por agotamiento negativo en un dispositivo de AutoMACS usando esferas magnéticas de MACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech). Las células NK purificadas se mezclan con las células SKBR3 opsonizadas en una proporción de 5:01 y se incuban durante 4 horas a 37 ° C. Después, se añade el colorante actinomicina 7-amino de fluorescencia (7-AAD), que tiñe específicamente las células apoptóticas. Las células apoptóticas SKBR3 se enumeran en el FACS como células dobles positivas a 7-AAD/CFSE. Los Fcab específicos de Her2 H10-03-6 y ABEFs0101 demostraron ser potentes mediadores de la muerte de las células SKBR3, con valores de CD_{50} de 1,1 nM y 1,0 nM, respectivamente. El mecanismo de la inducción de apoptosis es dependiente de la presencia de células NK que demuestra que los Fcab específicos de Her2 poseen funcionalidad de ADCC..

Ejemplo 7: Expresión en levaduras de Fab 4D5

Para la expresión de un fragmento fab en levaduras, El vector de expresión en levadura pYD1 (Invitrogen) (SEC ID N 72 / Figura 17) se modifica como sigue:

Se introduce un sitio de restricción NheI mediante mutagénesis dirigida al sitio en la posición 581/586 para producir el vector modificado pYD1 Nhe (SEC ID N ° 73 / Figura 18). Este vector se restringe con NheI y PmeI, para producir 3 fragmentos. El fragmento más grande es el esqueleto del vector restante, en el que se inserta un ligador oligonucleótido sintético para producir el vector de pYD1Ink (SEC ID N ° 74 / Figura 19). Un casete que incluye la región de terminación de la transcripción MAT α es luego amplificada por PCR a partir del vector pYD1 y se clona en pYD1Ink a través de BamHI y PstI de restricción y ligación. El vector resultante es pYD1mata (SEC ID N ° 75 / Figura 20). Un casete que contiene el promotor GAL1, el gen que codifica para AGA2 y un ligador sintético con sitios de clonación NotI y SfiI se amplifica por PCR a partir de pYD1 y se clona en pYD1mata a través de la restricción EcoRI y PacI para producir el vector pYD1gal (SEQ.ID N ° 76 / Figura 21).

Como un ejemplo para un Fab que se muestra en la levadura los genes que codifican para VH-CH1 y VL-CL, respectivamente, del anticuerpo 4D5 (Herceptin) se hacen sintéticamente (secuencias 4D5H (SEC ID N ° 77 / Figura 22) y 4D5L (SEC ID N ° 78 / Figura 23)).

4D5H está flanqueada por los sitios de restricción SfiI y NotI, y se clona en el vector pYD1gal para producir el vector pYD4D5hc (SEC ID N ° 79 / Figura 24). En este vector, el N-terminal de 4D5H se fusiona con el extremo C-terminal de AGA2, y en el extremo C-terminal de 4D5H, un marcador de hexahistidina está unido, seguido por el codón de terminación. La secuencia de aminoácidos de VH-CH1 de 4D5 se da en 4D5hp (SEC ID No.80 / Figura 25).

4D5 está flanqueado por los sitio de restricción NcoI y AscI . y se clona en el vector pYD1gal para producir el vector pYD4D5hc (SEC ID N ° 79 / Figura 26). 4D5L está precedida por una señal de secreción de AGA2, y lleva un codón de terminación después del residuo de cisteína C-terminal del dominio CL. La secuencia de aminoácidos de VL-CL de 4D5 se da en 4D5lp (SEC ID No.82 / Figura 27).

Para la expresión de Fab 4D5, el vector pYD4D5hl se transforma en la cepa de levadura EBY100 (Invitrogen), s se seleccionan los transformantes en medio mínimo sin triptófano, y la expresión de la proteína recombinante se induce por crecimiento en un medio que contiene galactosa de acuerdo con protocolos estándar (Invitrogen).

Ejemplo 8: Construcción de una biblioteca con restos aleatorizados en los bucles estructurales del dominio CL de 4D5 Fab

Como primer paso en la construcción de la biblioteca de presentación en levadura, l el dominio CL silvestre (kappa C) se corta del vector de expresión pYD4D5hl (SEC ID N ° 81) con las enzimas de restricción BsiWI y AscI. Se prepara un gen sintético que codifica dominios kappa C humanos flanqueados por BsiWI y AscI (en el contexto de acuerdo con pYD4D5hl) en el que se introducen mutaciones e inserciones aleatorias, respectivamente, en los bucles AB y EF. En este ejemplo en particular, la inserción de los codones NNB 3. 4 o 5, se realiza entre los aminoácidos 16 y 17 del dominio C kappa humano, una posición de residuo 92 , 93, 94, 95, 97, 98 y99 está sustituidos por los codones NNB. (IMGT, numeración, (véase la Figura 2). Un codón NNB contiene los 4 nucleótidos en las posiciones 1 y 2 y C- G y T en la posición 3. Por tanto, NNB codifica los 20 aminoácidos de origen natural.

La biblioteca se prepara y se selecciona siguiendo procedimientos convencionales.

Como ligando estructural se usa epítomos 4D5 y Her2neu diana de CR. Dichos miembros de la biblioteca se seleccionan para la producción de un anticuerpo modular citotóxico que tiene un sitio de unión modificado por

ingeniería en el dominio CL, que es una unión específica a una molécula efectora, tal como un receptor Fc gamma. TEI Fab resultante se analiza para determinar su (i) unión a Her2neu con una $K_d < 10^{-8}$ M y una $CI_{50} < 10^{-8}$ M, y (ii) la función efectora, usando un ensayo de CDC y/o ADCC.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo modular citotóxico, que se une específicamente a una superficie celular diana con una afinidad de unión de $kd < 10^{-8}$ M, que es un Fc de unión a antígeno (Fcab) de una molécula de anticuerpo con función efectora, que es al menos una actividad de ADCC, ADCP y CDC con un sitio de unión a antígeno modificado en la región bucle de un dominio CH3 para unirse a dicha diana de la superficie celular, en donde la diana de la superficie celular es un receptor de la clase erbB.
2. Anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene actividad ADCC.
3. Anticuerpo modular de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho sitio de unión a antígeno comprende una secuencia de anticuerpo aleatorizada.
4. Anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sitio de unión a antígeno se localiza en el intervalo de los aminoácidos 7 a 21, los aminoácidos 25 a 39, los aminoácidos 41 a 81, los aminoácidos 83 a 85, los aminoácidos 89 a 103 y los aminoácidos 106 a 117, en donde la numeración es conforme al esquema de numeración de IMGT.
5. Anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un Fc de IgG1.
6. Anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha diana se selecciona del grupo que consiste en EGFR Her2, Her2neu, HER3 y HER4.
7. Anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho sitio de unión a antígeno se une específicamente a Her2 y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los números de SEC ID como se indican en las Tablas 4 y 5, contenido en un bucle EF y/o AB y/o CD.
8. Anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se puede obtener de una biblioteca de un oligómero de dominios de anticuerpo modular que se unen a un ligando efector.
9. Molécula de combinación que comprende un anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 con otros péptidos o polipéptidos.
10. Anticuerpo modular de combinación que comprende un anticuerpo modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además está combinado con uno o más anticuerpos modulares modificados o con anticuerpos modulares no modificados o partes de los mismos.
11. Anticuerpo modular de combinación de acuerdo con la reivindicación 10, que es una molécula de anticuerpo completa.
12. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11,
13. Método de producción de un anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas de:
 - a. proporcionar una biblioteca de Fcab
 - b. poner en contacto dicha biblioteca con dicha diana en presencia de un ligando efector,
 - c. seleccionar un miembro de la biblioteca que tenga ambas propiedades,
 - (i) afinidad por la unión a la diana de $kd < 10^{-8}$ M o $CI50 < 10^{-8}$ M, y
 - (ii) actividad ADCC, ADCP y CDC, y
 - d. fabricar una preparación del anticuerpo modular,
14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la biblioteca contiene miembros que tienen una secuencia de anticuerpo aleatorizada.
15. Método de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, que además comprende la etapa de maduración de la afinidad de dicho miembro de la biblioteca.
16. Anticuerpo modular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para usar en el tratamiento de un paciente que sufra un tumor sólido, en donde el tumor expresa un receptor de la clase erbB,

Figura 1:

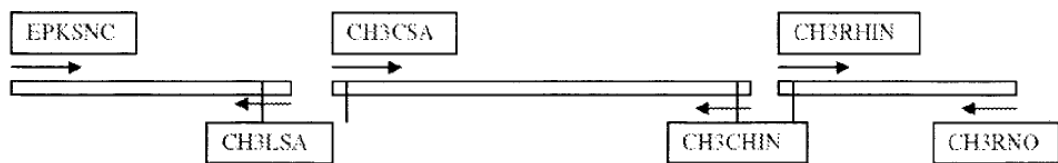


Figura 2:

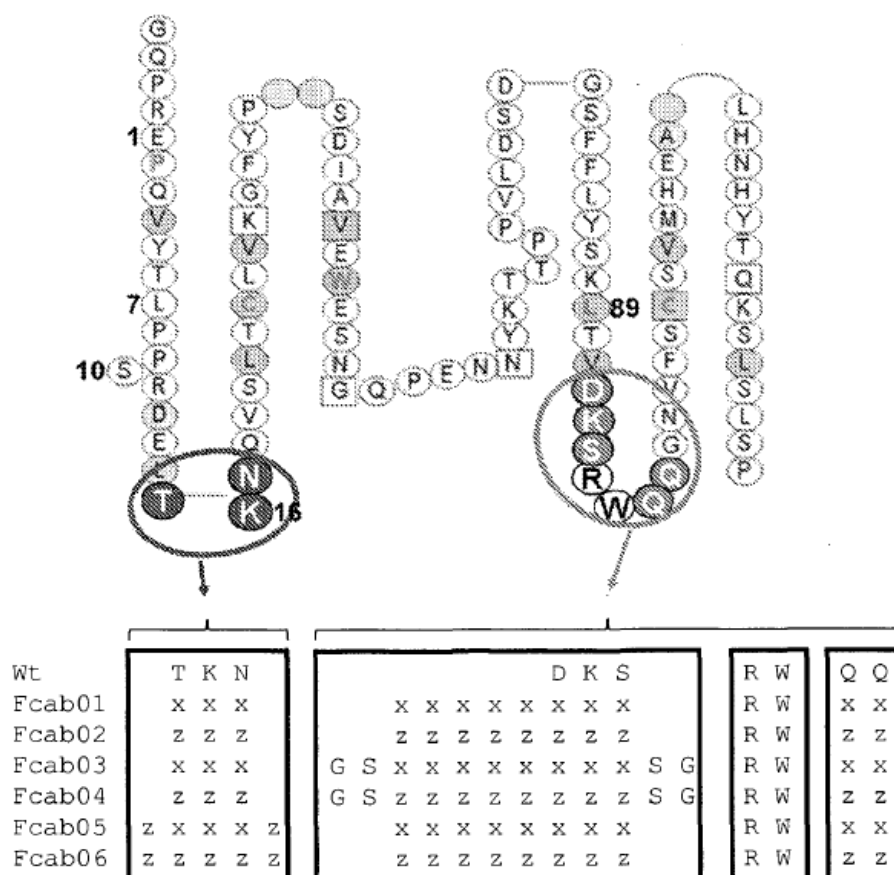


Figura 3 (SEC ID N° 1): estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1

EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	60
NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	120
ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	180
PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFSC	SVMHEALHNN	YTQKSLSLSP	GK	232

Figura 4 (SEC ID N° 2): IgG humana que incluye modificaciones de aminoácidos aleatorizada:

EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	60
NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	120
ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELXXXQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	180
PVLDSGDSFF	LYSKLTVXXX	XXXXRWXXG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK	237

Figura 5 (SEC ID N° 11): secuencia de aminoácidos de FcabRGD4L

EPKSCDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	60
NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	120
ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTP	180
PVLDSGDSFF	LYSKLTVGCR	GDCLSRWQQG	NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGKEGG	240
GSAAAEQKLI	SEEDLNGAAT	VESCLAKPHT	ENSFNVWVKD	DKTLDRYANY	EGCLWNATGV	300
VVCTGDETQC	YGTWVPIGLA	IPENEGGGSE	GGGSEGGGSE	GGGTPPEYIG	DTPIPGYTYI	360
NPLDGYTPPG	TEQNPNPNP	SLEESQPLNT	FMFQNNRFRN	RQGALTVYTG	TVTQGTDPVK	420
YYYQYTPVSS	KAMYDAYWNG	KFRDCAFHSG	FNEDPFVCEY	QGQSSDLPQP	PVNAGGGSGG	480
SGGGGSEGGG	SEGGGSEGGG	SEGGGSGGGG	SGGDFDYDKM	ANANKGAMTE	NADENALQSD	540
AKGKLDSVAT	DYGAAIDGFI	GDVSGLANGN	GATGDFAGSN	SQMAQVGDGD	NSPLMNNFRQ	600
YLPSPQSVSE	CRPYVFGAGK	PYEFSIDCDK	INLFRGVFAF	LLYVATFMYV	FSTFANILHK	660
ES						662

Figura 6 (SEC ID N° 12): vector pHENFcabRGD4

gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatatt	tataggttaa	tgtcatgata	ataatgggtt	60
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccctatt	tggtttatatt	120
tctaaatata	tcaaatatag	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
aattattgaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttcgg	tgtcgccctt	attccctttt	240
ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	acccagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaac	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctc	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	cggggcaaga	gcaactcggt	cgcgcataac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtcg	ccataaccat	gagtataaac	actgcccga	600
acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactgcgcct	gatcgtttgg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttatttgt	gataaatctg	900
gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
ccggtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gttaggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	accaaatacc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccocgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaattc	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgttggt	ttgtttgccg	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aataactgtcc	1380
ttctagtgtg	gcgtagtga	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggttggtact	aagacgatag	ttaccggata	aggcgacggc	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggg	ggacaggtat	cgggtaagcg	1680
gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttcacgg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740

atagtcctgt	cgggttttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atTTTTgtga	tgctcgtcag	1800
gggggaggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacgggtt	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	gcgcgagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	taacgaaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgaagcga	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagcct	aagcttgcac	gcaaattcta	tttcaaggag	acagtcataa	2280
tgaaataacct	attgcctacg	gcagcgcgtg	gattgttatt	actcgcggcc	cagccggcca	2340
tgcccgagcc	caaactctgt	gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaac	2400
tcctgggggg	accgtcagtc	ttcctcttcc	ccccaaaaac	caaggacacc	ctcatgatct	2460
cccggaaccc	tgaggtcaca	tgctgtgtgg	tggaagtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	2520
agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	2580
acgagtacaa	cagcacgtac	cgtgtgtgta	gcgtccctac	cgctctgcac	caggactggc	2640
tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	2700
aaacatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	2760
cccgggatga	gctgaccaag	aaccaggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	2820
ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	2880
cgctcccgct	gttggaactc	gacggctcct	ttctctctta	cagcaagcct	accgtggggt	2940
gccgcgggtg	ttgtctgagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tcctgtatgc	3000
atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaagcgg	3060
ccgcagaaca	aaaactcatc	tcagaagagg	atctgaatgg	ggccgcatag	actgttgaaa	3120
gttgttttag	aaaacctcat	acagaaaatt	catttactaa	cgtctggaaa	gacgacaaaa	3180
ctttagatcg	ttacgctaac	tatgagggct	gtctgtggaa	tgctacaggc	gttgtgtgtt	3240
gtactgggtg	cgaaactcag	tgttacggta	catgggttcc	tattgggctt	gctatccctg	3300
aaaatgaggg	tggtggctct	gaggggtggc	gttctgaggg	tgccggttct	gaggggtggc	3360
gtactaaacc	tcctgagtac	ggtgatacac	ctattccggg	ctatacttat	atcaaccctc	3420
tcgacggcac	ttatccgcct	ggtactgagc	aaaaccccg	taatccta	ccttctcttg	3480
aggagtctca	gcctctta	actttcatgt	ttcagaataa	taggttcoga	aataggcagg	3540
gtgcattaac	tgttttatac	ggcactgtta	ctcaaggcac	tgaccccggt	aaaacttatt	3600
accagtacac	tcctgtatca	tcaaaagcca	tgatgatgcg	ttactgggaa	ggtaaattca	3660
gagactgcgc	tttccattct	ggctttaatg	aggatccatt	cgtttgtgaa	tatcaaggcc	3720
aatcgtctga	cctgcctcaa	cctcctgtca	atgctggcgg	cgctctggt	ggtggttctg	3780
gtggcggttc	tgaggggtgg	ggctctgagg	gtggcggttc	tgaggggtgg	ggctctgagg	3840
gtggcggttc	cggtggcggc	tcgggttccg	gtgattttga	ttatgaaaaa	atggcaaacg	3900
ctaataaggg	ggctatgacc	gaaaatgccg	atgaaaacgc	gctacagtct	gacgctaaag	3960
gcaaaactga	ttctgtcgct	actgattacg	gtgctgctat	cgatgggttc	attggtgacg	4020
tttcggcctt	tgctaattgg	aatgggtgct	ctggtgattt	tgctggctct	aattcccaaa	4080
tggtcgaagt	cggtgacggt	gataattcac	ctttaatgaa	taatttccgt	caatattttac	4140
cttcttttgc	tcagtgcgtt	gaatgtcgcc	cttatgtctt	tgccgctggt	aaacatattg	4200
aattttctat	tgattgtgac	aaaataaact	tattccgtgg	tgctcttgcg	tttcttttat	4260
atgttgccac	ctttatgtat	gtattttcga	cgtttgtctt	catactgcat	aaggagtctt	4320
aataagaatt	cactggccgt	cgttttacaa	cgctgtgact	gggaaaaccc	tgccgttacc	4380
caacttaatc	gccttgacgc	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatag	cgaagaggcc	4440
cgcaccgac	gcccttccca	acagttgcgc	agcctgaatg	gcgaatggcg	cctgatgcgg	4500
tattttctcc	ttacgcacat	gtgcgggtatt	tcacaccgca	cgtcaaagca	accatagtac	4560
gcgcctgta	gcggcgcat	aagcgcgccg	ggtgtgtgtg	ttacgcgcag	cgtgaccgct	4620
acacttgcca	gcgccttagc	gcccgctcct	ttcgcttctt	tccttccctt	tctcgccacg	4680
ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	ccgatttagt	4740
gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattttgggtg	atggttcacg	tagtgggcca	4800
tcgccttgat	agacggtttt	tcgccttttg	acgtttggagt	ccacgttctt	taatagtggg	4860
ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	gctattcttt	tgattttataa	4920
gggattttgc	cgatttcggc	ctatttggtt	aaaaatgagc	tgattttaaca	aaaatttaac	4980
gcgaatttta	acaaaatatt	aacgtttaca	attttatggt	gcactctcag	tacaatctgc	5040
tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	caccgcgcaa	caccgcgtga	cgcgcctga	5100
cgggcttgtc	tgctcccgcc	atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	5160
atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga			5200

Figura 7 (SEC ID N° 14): vector pHENFcabRGD4L

gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatctt	tatagggttaa	tgctcatgata	ataatggttt	60
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccctatt	tggtttatctt	120
tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgtctc	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
aattattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacattttccg	tgctgcctct	attccctttt	240
ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgtct	acccagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaat	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctg	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgcgcatac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtct	ccataaccat	gagtataaac	actgcccga	600
acttacttct	gacaacgata	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggaacaaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
gcgaactact	tacttagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tgcgcccctc	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccggtga	gcgtgggtct	cgcgggtatc	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gatagggtcc	tacttgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	gaaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaactc	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgccc	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagaccgc	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gccagccttg	gagcgaacga	cctacaccca	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	ccggtaagcg	1680
gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag	1800
gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt	1980
cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaaac	gcctctcccc	gcgcgttgcc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaact	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgtctc	2160
cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagctt	aagcttgcac	gcaaattcta	tttcaaggag	acagtcataa	2280
tgaataacct	attgcctacg	gcagccgctg	gattgttatt	actcgcggcc	cagccggcca	2340
tgcccgagcc	caaactctgt	gacaaaactc	acacatgcc	accgtgccca	gcacctgaac	2400
tcctgggggg	accgtcagtc	ttctcttctc	cccaaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	2460
cccggacccc	tgaggtcaca	tgctgtgtgg	tggaactgag	ccacgaagac	cctgaggtca	2520
agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcaataatg	caagacaaag	ccgcgggagg	2580
agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtgtgca	gcgtcctcac	cgctcctgac	caggactggc	2640
tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	2700
aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacac	ctgcccccat	2760
ccgggatga	gctgaccaag	aaccaggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	2820
ccagcgacat	cgccgtggag	tggaagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	2880
cgcctcccg	gctggactcc	gacggctcct	ttctcctcta	cagcaagctt	accgtgggtt	2940
gccgcggtga	ttgtctgagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tcggtgatgc	3000
atgaggtctc	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaggagg	3060
gtggtggctc	tgccggccga	gaacaaaaac	tcactctcaga	agaggatctg	aatggggccg	3120
catagactgt	tgaagttgt	ttagcaaaac	ctcatacaga	aaattcattt	actaacgtct	3180
ggaaaagacga	caaaaactta	gatcgttacg	ctaactatga	gggctgtctg	tggaatgcta	3240
caggcggtgt	ggtttgtact	ggtgacgaaa	ctcagtgtta	cggtacatgg	gttctctattg	3300
ggcttgctat	ccctgaaaat	gaggggtggg	gctctgaggg	tgccggttct	gaggggtggc	3360
gttctgaggg	tgccggtact	aaacctcctg	agtacgggtg	tacacctatt	ccgggctata	3420
cttatatcaa	ccctctcgac	ggcacttatc	cgcctgggtac	tgagcaaaac	cccgttaatc	3480
ctaactcctc	tcttgaggag	tctcagcctc	ttaatacttt	catgtttcag	aataataggt	3540
tccgaaatag	gcagggtgca	ttaactgttt	atacgggcac	tgttactcaa	ggcactgacc	3600
ccgttaaaac	ttattaccag	tacactcctg	tatcatcaaa	agccatgtat	gacgcttact	3660

ggaacggtaa	attcagagac	tgcgctttcc	attctggett	taatgaggat	ccattcgttt	3720
gtgaatatca	aggccaatcg	tctgacctgc	ctcaacctcc	tgtcaatgct	ggcggcggt	3780
ctggtggtgg	ttctggtggc	ggctctgagg	gtggcggtcc	tgagggtggc	ggttctgagg	3840
gtggcggtcc	tgagggtggc	ggttccggtg	gcggctccgg	ttccggtgat	tttgattatg	3900
aaaaaatggc	aaacgctaata	aaggggggcta	tgaccgaaaa	tgccgatgaa	aacgcgctac	3960
agctcgacgc	taaaggcaaa	cttgattctg	tcgctactga	ttacggtgct	gctatcgatg	4020
gtttcattgg	tgacgtttcc	ggccttgcta	atggtaatgg	tgctactggg	gattttgctg	4080
gctctaattc	ccaaatggct	caagtcgggtg	acgggtgataa	ttcaccttta	atgaataatt	4140
tccgtcaata	tttaccttct	ttgcctcagt	cgggttgatg	tcgcccttat	gtctttggcg	4200
ctggtaaaac	atatgaattt	tctattgatt	gtgacaaaat	aaactttatc	cgtggtgtct	4260
ttgcgtttct	tttataatgt	gccaccttta	tgtatgtatt	ttcgacgttt	gctaacatac	4320
tgcataagga	gtcttaataa	gaattcactg	gccgtcggtt	tacaacgtcg	tgactgggaa	4380
aacctggagc	taaccgaact	taatgccttc	gcagcacatc	cccctttcgc	cagctggcgt	4440
aatagcgga	aggcccgac	cgatcgccct	tcccaacagt	tgccgagcct	gaatggcgaa	4500
tgccgctga	tgccgtattt	tctccttacg	catctgtgcg	gtatttcaca	ccgcacgtca	4560
aagcaaccat	agtacgcgc	ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcggtgtg	ggtggttaacg	4620
cgcagcgtga	ccgctacact	tgccagcgcc	ctagcgcccg	ctcctttcgc	tttcttccct	4680
tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	taaactcggg	gctcccttta	4740
gggttcogag	ttagtgcctt	acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgattt	gggtgatggt	4800
tcacgtagtg	ggccatcgcc	ctgatagacg	gtttttcgcc	ctttgacgtt	ggagtccacg	4860
ttctttaata	gtggactctt	gttccaaact	ggaacaacac	tcaaccttat	ctcgggctat	4920
tcttttgatt	tataagggat	tttgccgatt	tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	4980
taacaaaaat	ttaacgcgaa	ttttaacaaa	atattaacgt	ttacaatttt	atggtgcaat	5040
ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacccc	gccaaccccc	5100
gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	cgggcacccg	cttacagaca	agctgtgacc	5160
gtctccggga	gctgcatgtg	tcagaggttt	tcaccgctcat	caccgaaacg	cgcga	5215

Figura 8 (SEC ID N° 15): vector pYD1dX

acggattaga	agccgcccag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcccgcc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatcgca	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgattt	acttcttatt	caaagtgaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaattcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggcccaacgg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgtcag	taattgcggt	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccagtg	tggtggaatt	ctgcagatat	ccagcacagt	960
ggcgcccgct	cgatcgagtc	tagagggccc	ttcgaaggta	agcctatccc	taaccctctc	1020
ctcggtctcg	attctacgcg	taccggtcat	catcaccatc	accattgagt	ttaaaccgcg	1080
tgatctgata	acaacagtgt	agatgtaaca	aaatcgactt	tgttcccact	gtacttttag	1140
ctcgtacaaa	atacaatata	cttttctatt	ctccgtaaac	aacatgtttt	cccatgtaat	1200
atcctttttt	atttttcggt	cgtttaccaa	ctttacacat	actttatata	gctattcact	1260
tctatacact	aaaaaactaa	gacaattttt	attttgctgc	ctgccatatt	tcaatttggt	1320
ataaattcct	ataatttatc	ctattagtag	ctaaaaaaag	atgaatgtga	atcgaatcct	1380
aagagaattg	ggcaagtgc	caaacaatac	ttaaataaat	actactcagt	aataacctat	1440
ttcttagcat	ttttgacgaa	atttgtctat	ttgttagagt	cttttacacc	atttgtctcc	1500
acacctccgc	ttacatcaac	accaataacg	ccattttaatc	taagcgcac	accaacattt	1560
tctggcgctc	gtccaccagc	taacataaaa	tgtaagctct	cggggctctc	ttgcttcca	1620
accagtcag	aaatcgagtt	ccaatccaaa	agttcacctg	tcccacctgc	ttctgaatca	1680
aacaaggga	taaacgaatg	aggtttctgt	gaagctgcac	tgagtagtat	gttgagctct	1740
tttggaata	cgagctcttt	aataactggc	aaaccgagga	actcttggt	ttcttgccac	1800
gactcatctc	cgtgcagttg	gacgatatca	atgccgtaat	cattgaccag	agccaaaaca	1860

tcttccttag	gttgattacg	aaacacgcc	accaagtatt	tccgagtgcc	tgaactat	1920
ttatatgctt	ttacaagact	tgaatttttc	cttgcaataa	ccgggtcaat	tggtctcttt	1980
ctattgggca	cacatataat	accagcaag	tcagcatcgg	aactagagc	acattctgcg	2040
gcctctgtgc	tctgcaagcc	gcaaaccttc	accaatggac	cagaactacc	tgtgaaatta	2100
ataacagaca	tactccaagc	tgcccttctg	tgcttaatac	cgtatactca	cgtgctcaat	2160
agtcaccaat	gccctccctc	ttggccctct	ccttttcttt	tttcgaccga	atttcttgaa	2220
gacgaaaggg	cctcgtgata	cgccctat	tatagggtta	tgtcatgata	ataatggttt	2280
cttaggacgg	atcgcttgcc	tgtaacttac	acgcgcctcg	tatcttttaa	tgatggaata	2340
atgtgggaat	ttactctgtg	tttattttat	tttatgtttt	gtatttggat	tttagaaagt	2400
aaataaagaa	ggtagaagag	ttacggaatg	aagaaaaaaa	aataaaca	ggtttaaaaa	2460
atttcaacaa	aaagcgtact	ttacatatat	atttattaga	caagaaaagc	agattaaata	2520
gatatatact	cgattaaacg	taagtaaaat	gtaaaatcac	aggattttcg	tgtgtggtct	2580
tctacacaga	caagatgaaa	caattcggca	ttaatcctcg	agagcaggaa	gagcaagata	2640
aaaggtagta	tttgttggcg	atccccctag	agtcttttac	atcttcggaa	aacaaaaact	2700
attttttctt	taatttcttt	ttttactttc	tatttttaat	ttatatattt	atattaaaaa	2760
atttaaatta	taattatttt	tatagcacgt	gatgaaaagg	accaggtggg	cacttttctg	2820
ggaaatgtgc	gggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	2880
ctcatagagc	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	2940
attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	3000
gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	3060
ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	3120
cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtgtt	3180
gacgcgcggc	aagagcaact	cggtcgcgcg	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	3240
tactcaccag	tcacagaaaa	gcattcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	3300
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	3360
ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacacac	atgggggatac	atgtaactcg	ccttgatcgt	3420
tggaacccg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	3480
gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaa	tacttactct	agcttcccgg	3540
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagtgtcag	gaccacttct	gcgctcggcc	3600
cttcggctg	gctggtttat	tgtgtataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	3660
atcattcagc	cactggggcc	agatggttaag	ccctcccgtg	tcgtagtatt	ctacagcagc	3720
ggcagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgcctcactg	3780
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	3840
cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaa	3900
atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	3960
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	4020
ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctatacc	ctctttttcc	gaaggttaact	4080
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	4140
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaactct	gttaccagtg	4200
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	4260
gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgca	4320
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagcatt	gagaaagcgc	cacgcttccc	4380
gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgacag	4440
aggagccttc	caggggggaa	cgctgtgtat	ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	4500
tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	cgagcctatg	gaaaaacgcc	4560
agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcttgccc	ttttgctggc	cttttgcctc	catgttcttt	4620
cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	4680
gctcgcgcga	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	gcgaggaagc	ggaagagcgc	4740
ccaatacgcg	aaccgcctct	ccccgcgcgt	tgcccgatcc	attaatgcag	ctggcacgac	4800
aggtttccgc	actggaaaagc	gggcagtgag	ggcaacgcaa	ttaatgtgag	ttacctcact	4860
cattaggcac	cccaggcttt	acactttatg	cttccggctc	ctatgttgtg	tggaattgtg	4920
agcggataac	aatttcacac	aggaaacagc	tatgacctag	attacgcaa	gctcgaatt	4980
aaccctcact	aaagggaaca	aaagctggct	agt			5013

Figura 9 (SEC N° 16): vector pYD1dXFc

acggattaga	agccgcgcgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggaagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaatataca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatacagca	agcagtgatt	tttgatctat	300

ES 2 490 192 T3

taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagtta	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccgatcgg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcca	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgcag	taattgcgg	tctcaccct	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taagggtacca	ggatccgcta	gcaccaaggg	ccccagcgtg	ttccctctgg	960
ccccagctc	caagagcacc	tccggcgcca	ccggccgccc	gggctgcctg	gtgaaggatt	1020
acacctgat	gcccgtgacc	gtgagctgga	acagcggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	1080
cctttccgcg	cgtgctgcag	tccagcggcc	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	1140
ccagcagcag	cctgggcacc	cagacctaca	tctgcaatgt	gaaccacaag	cccagcaata	1200
ccaaggtgga	taagaaggtg	gagcccaaga	gcagcgacaa	gacacacacg	tgtcccccat	1260
gtcccgcccc	tgagctgctg	ggcgccctt	ccgtgttcc	gttccctccc	aagccaaagg	1320
acacctgat	gatctcccg	acccctgagg	tgacctgtgt	ggtggtggac	gtgagccacg	1380
aggaccacga	ggtgaagttc	aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaaga	1440
ccaagcctag	agaggagcag	tacaacagca	cctaccgcgt	ggtgagcgtg	ctgaccgtgc	1500
tgcaccagga	ttggtgta	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtgagcaac	aaggccctgc	1560
ctgcccccat	cgagaagacc	atctccaagg	ccaagggcca	gcctcgagaa	ccacaggtgt	1620
acacctgccc	ccatcccg	gttagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	1680
tcaaaggctt	ctatcccagc	gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	1740
acaactacaa	gaccacgcct	cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	1800
agctcacctg	ggacaagagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	1860
atgaggtctt	gcacaaccac	tacacacaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaatgag	1920
cggcgctcgt	atcgagtcta	gagggccctt	cgaaggtaag	cctatcccta	acctctcct	1980
cggctctgat	tctacgcgta	ccggtcatca	tcaccatcac	cattgagttt	aaaccgcgtg	2040
atctgataac	aacagtgtag	atgtaacaaa	atcgactttg	ttcccactgt	acttttagct	2100
cgtacaaaa	acaatatact	tttcatctt	ccgtaaacaa	catgttttcc	catgtaatat	2160
ccttttctat	ttttogttcc	gttaccaact	ttacacatac	tttatatagc	tattcacttc	2220
tatacactaa	aaaactaaga	caattttta	tttgcctgct	gccatatttc	aatttgttat	2280
aaattcctat	aatttatcct	attagtagct	aaaaaaagat	gaatgtgaat	cgaatcctaa	2340
gagaattggg	caagtgcaca	aacaatactt	aaataaatac	tactcagtaa	taacctattt	2400
cttagcattt	ttgacgaat	ttgctatttt	gttagagtct	tttacaccat	ttgtctccac	2460
acctccgctt	acatcaaac	caataacgcc	atttaattcta	agcgcatcac	caacattttc	2520
tggcgctcagt	ccaccagcta	acataaaatg	taagctctcg	gggctctctt	gccttccaac	2580
ccagtacaga	atcgagttcc	aatccaaaag	ttcacctgtc	ccacctgctt	ctgaatcaaa	2640
caagggaata	aacgaatgag	gtttctgtga	agctgcactg	agtagtatgt	tgagctcttt	2700
tggaaatacg	agtcttttaa	taactggcaa	accgaggaac	tcttgggtatt	cttgccaaga	2760
ctcatctccg	tgcagttgga	cgatatcaat	gccgtaatca	ttgaccagag	ccaaaacatc	2820
ctccttaggt	tgattacgaa	acacgccaac	caagtatttc	ggagtgcctg	aactattttt	2880
atatgctttt	acaagacttg	aaattttcct	tgcaataacc	gggtcaattg	ttctctttct	2940
attgggcaca	catataatac	ccagcaagtc	agcatcgga	tctagagcac	attctgcggc	3000
ctctgtgctc	tgcaagccgc	aaactttcac	caatggacca	gaactacctg	tgaaattaat	3060
aacagacata	ctccaagctg	cctttgtgtg	cttaatacacg	tatactcacg	tgctcaatag	3120
tcaccaatgc	cctccctctt	ggccctctcc	ttttcttttt	tcgaccgaat	ttcttgaaga	3180
cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcattgataat	aatggtttct	3240
taggacggat	cgcttgctg	taacttacac	gcgcctcgta	tcttttaatg	atggaataat	3300
ttgggaattt	actctgtgtt	tattttattt	tatgttttgt	atttggattt	tagaaagtaa	3360
ataaagaagg	tagaagagtt	acggaatgaa	gaaaaaaaaa	taaacaaaag	tttaaaaaat	3420
ttcaacaaaa	agcgtacttt	acatatatat	ttattagaca	agaaaagcag	attaaataga	3480
tatacattcg	attaacgata	agtaaaatgt	aaaatcacag	gattttcgtg	tggtgtcttc	3540
tacacagaca	agatgaaaca	attcggcatt	aatacctgag	agcaggaaga	gcaagataaa	3600
aggtagtatt	tgttggcgat	ccccctagag	tcttttacat	cttcggaaaa	caaaaactat	3660
ttttctctta	atttcttttt	ttactttcta	tttttaattt	atataatttat	attaaaaaat	3720
ttaaattata	attattttta	tagcacgtga	tgaaggagac	ccaggtggca	cttttcgggg	3780
aaatgtgcgc	ggaaccccta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgatccgct	3840
catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	3900
tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	3960

tcacccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggtg	4020
ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	4080
ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	cccgtgttga	4140
cgccggggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	4200
ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tgccatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	4260
tgccataacc	atgagtata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	4320
gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcggtg	4380
ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgttagc	4440
aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tggcgaaacta	cttactctag	cttcccgga	4500
acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcgccct	4560
tcgggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	4620
cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatc	gtagtattct	acacgcggg	4680
cagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggtg	cctcactgat	4740
taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	attttaaact	4800
tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacaaaaat	4860
cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	4920
ttcttgagat	cttttttttc	tgccgcta	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	4980
agggagagtg	gctttgttgc	cggtacaa	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	5040
cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	ccttctagt	tagccgtagt	tagggccacca	5100
cttcaagaac	tctgtagcac	cgccctacata	cctcgctctg	ctaactcctgt	taccagtggc	5160
tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	cggtgtggac	tcaagacgat	agttaccgga	5220
taaggcgag	cggtcggtgt	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tgagcggaac	5280
gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	cgcttccga	5340
agggagaaa	gcggacaggt	atccggtaag	cgccagggtc	ggaacaggag	agcgacgag	5400
ggagcttcca	ggggggaacg	cctggtatct	ttatagtctt	gtcgggtttc	gccacctctg	5460
acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgct	agggggggcg	agcctatgga	aaaacgcccag	5520
caacgcggcc	tttttacggt	tcttgccctt	ttgctggcct	tttgcctaca	tggtctttcc	5580
tgcgttatcc	cctgattctg	tggtataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	5640
tcgcgcgagc	cgaacgaccg	agcgagcgca	gtcagtgagc	gaggaagcgg	aagagcgccc	5700
aatacgcaaa	cgccctctcc	cgccgcgttg	gcgcgattcat	taatgcagct	ggcagcacag	5760
gtttcccgac	tggaagcggg	gcagtgagcg	caacgcgaatt	aatgtgagtt	acctcactca	5820
ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	tcgggtcctt	atgtgtgtgt	gaattgtgag	5880
cggtataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	tcggaattaa	5940
ccctcactaa	agggaaacaaa	agctggctag	t			5971

Figura 10 (SEC ID N° 17): pYD1CH12

acggattaga	agccgcgag	cggttgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgccgccc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagttaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccgatcgcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaaatatt	aagctaattc	tacttcatat	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aatcagtaa	720
cgtttgctag	taattgcggt	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtagtg	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtgtgtg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggttg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtagca	ggatccgcta	gcaccaaggg	ccccagcgtg	ttccctctgg	960
ccccagctc	caagagcacc	tccggcgga	ccgccgccct	gggctgcctg	gtgaaggatt	1020
acttcccaga	gcccgtagcc	gtgagctgga	acagcggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	1080
cctttccgcg	cgtgctgcag	tccagcggcc	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	1140
ccagcagcag	cctgggcacc	cagacctaca	tctgcaatgt	gaaccacaag	cccagcaata	1200
ccaaggtgga	taagaagggtg	gagcccaaga	gcagcgacaa	gacacacacg	tgtcccccat	1260
gtcccgcgcc	tgagctgctg	ggcgccctt	ccgtgttcc	gttccctccc	aagccaaagg	1320
acaccctgat	gatctcccg	acccctgagg	tgacctgtgt	ggtggtggac	gtgagccacg	1380
aggacccaga	ggtgaagttc	aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaga	1440

ccaagcctag	agaggagcag	tacaacagca	cctaccgcgt	ggtgagcgtg	ctgaccgtgc	1500
tgcaccagga	ttggctgaat	ggcaaggagt	acaagtgcga	ggtgagcaac	aaggccctgc	1560
ctgcccccat	cgagaagacc	atctccaagg	ccaagggccca	gcctcgaggc	cgctcgatcg	1620
agtctagagg	gcccttcgaa	ggtaagccta	tccctaacc	tctcctcggt	ctcgattcta	1680
cgcgtagcgg	tcacatcac	catcaccatt	gagtttaaac	ccgctgatct	gataacaaca	1740
gtgtagatgt	aacaaaatcg	actttgttcc	cactgtactt	ttagctcgta	caaaatacaa	1800
tatacttttc	atttctccgt	aaacaacatg	ttttcccatg	taataatcctt	ttctattttt	1860
cgttccgtta	ccaactttac	acatacttta	tatagctatt	cacttctata	cactaaaaaa	1920
ctaagacaat	tttaattttg	ctgcctgcca	tatttcaatt	tgttataaat	tcctataatt	1980
tatcctatta	gtagctaaaa	aaagatgaat	gtgaatcgaa	tcctaagaga	attgggcaag	2040
tgcacaaaca	atacttaaat	aaatactact	cagtaataac	ctatttctta	gcatttttga	2100
cgaaatttgc	tattttgtta	gagtccttta	caccatttgt	ctccacacct	ccgcttacat	2160
caacaccaat	aacgccattt	aatctaagcg	catcaccaac	attttctggc	gtcagtcac	2220
cagctaaca	aaaatgtaag	ctctcggggc	tctcttgcc	tccaaccag	tcagaaatcg	2280
agttccaatc	caaaagttca	cctgtccac	ctgcttctga	atcaaacaag	ggaataaacg	2340
aatgaggttt	ctgtgaagct	gcactgagta	gtatgttgca	gtcttttga	aatacagagtc	2400
ttttaataac	tggcaaaccg	aggaactctt	ggtattcttg	ccacgactca	tctccgtgca	2460
gttgagcagat	atcaatgccg	taatcattga	ccagagccaa	aacatcctcc	ttaggttgat	2520
tacgaaacac	gccaaccaag	tatttcggag	tgccgaact	atttttatat	gcttttacaa	2580
gacttgaat	tttcttgca	ataaccgggt	caattgttct	ctttctattg	ggcacacata	2640
taatacccag	caagtcagca	tcggaatcta	gagcacattc	tgccgctct	gtgctctgca	2700
agccgcaaac	tttaccacat	ggaccagAAC	tacctgtgaa	attaataaca	gacatactcc	2760
aagctgcctt	tgtgtgctta	atcacgtata	ctcacgtgct	caatagtcac	caatgcctc	2820
cctcttgccc	ctctcctttt	cttttttoga	ccgaatttct	tgaagacgaa	agggcctcgt	2880
gatacgctta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	gtttcttagg	acggatcgct	2940
tgctgtaac	ttacacgcgc	ctcgtatctt	ttaatgatgg	aataatttgg	gaatttactc	3000
tgtgtttatt	tatttttatg	ttttgtattt	ggattttaga	aagtaaataa	agaaggtaga	3060
agagttacgg	aatgaagaaa	aaaaataaaa	caaaggttta	aaaaatttca	acaaaaagcg	3120
tactttacat	atatatttat	tagacaagaa	aagcagatta	aatagatata	cattcgatta	3180
acgataagta	aatgtaaaa	tcacaggatt	ttcgtgtgtg	gtcttctaca	cagacaagat	3240
gaaacaattc	ggcattaata	cctgagagca	ggaagagcaa	gataaaaggt	agtatttgtt	3300
ggcgatcccc	ctagagctct	ttacatcttc	ggaaaacaaa	aactattttt	tctttaattt	3360
ctttttttac	tttctatttt	taattttatat	atttatatta	aaaaatttaa	attataatta	3420
ttttttatagc	acgtgatgaa	aaggaccacg	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	3480
cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaataatga	tccgctcatg	agacaataac	3540
cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	3600
tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttctctg	ttttgtcac	ccagaaacgc	3660
tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaaactgg	3720
atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgcccgga	agaacgtttt	ccaatgatga	3780
gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcg	tattatcccg	tgttgacgcc	gggcaagagc	3840
aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttgg	tgagtactca	ccagtcacag	3900
aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtgcc	ataaccatga	3960
gtgataaac	tgccggccac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	4020
cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	tcgttgggaa	ccggagctga	4080
atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	4140
tgcgcaaac	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	4200
ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggt	4260
ttattgtctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	cggatcatt	gcagcactgg	4320
ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	gacgggcagt	caggcaacta	4380
tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	4440
tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	4500
aaaggatcta	ggtgaagatc	cttttttgata	atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	4560
tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	4620
tttttctgcg	cgtaatctgc	tgttgcaaaa	caaaaaaac	accgctacca	gcggtggttt	4680
gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	4740
agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	4800
tagcaccgcg	tacatacctc	gctctgctaa	tctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	4860
ataagtctgt	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	accggataag	gcgcagcgg	4920
cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	gcgaacgacc	tacaccgaac	4980
tgagatacct	acagcgtgag	cattgagaaa	gcgccacgct	tcccgaagg	agaaagcg	5040
acaggtatcc	ggtaaagcgc	agggctcgaa	caggagagcg	cacgagggag	cttccagggg	5100

ggaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	5160
ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcccagcc	tatggaaaaa	cgccagcaac	gcggcctttt	5220
tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	ctttcctgcg	ttatccccctg	5280
attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgcgtcga	taccgctcgc	cgcagccgaa	5340
cgaccgagcg	cagcagtcga	gtgagcgagg	aagcgggaaga	gcgcccata	cgcaaacccgc	5400
ctctccccgc	gcgttgcccg	attcattaat	gcagctggca	cgacagggtt	cccgaactgga	5460
aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttacct	cactcattag	gcaccccagg	5520
ctttacactt	tatgcttcog	gtcctatgt	tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	5580
acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	caaagctcgg	aattaaccct	cactaaaggg	5640
aacaaaagct	ggctagt					5657

Figura 11 (SEC ID N° 18): _Fcab01

ggcccagccg	gccatggccg	agcccaaate	ttgtgacaaa	actcacacat	gcccaccgtg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aacccaagga	120
caccctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	360
agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacagggtgta	420
caccctgccc	ccatcccggg	atgaactgnn	bnnbnnbcag	gtcagcctga	cctgcctggt	480
caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gtcacccgtg	nnbnnbnnbn	nnbnnbnnbn	bnnbaggtgg	nnbnnbggga	acgtcttctc	660
atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	720
tccgggtaaa	gcggccgc					738

Figura 12 (SEC ID N° 19): _Fcab02

ggcccagccg	gccatggccg	agcccaaate	ttgtgacaaa	actcacacat	gcccaccgtg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aacccaagga	120
caccctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	360
agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacagggtgta	420
caccctgccc	ccatcccggg	atgagctgkm	tkmtkmtcag	gtgagcctga	cctgcctggt	480
caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gtcacccgtg	mtkmtkmtk	mtkmtkmtkm	tkmtaggtgg	kmtkmtggga	acgtcttctc	660
atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	720
tccgggtaaa	gcggccgc					738

Figura 13 (SEC ID N° 20): Fcab03

ggcccagccg	gccatggccg	agcccaaate	ttgtgacaaa	actcacacat	gcccaccgtg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aacccaagga	120
caccctcatg	atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	360
agcccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacagggtgta	420
caccctgccc	ccttcccggg	atgagctgnn	bnnbnnbcag	gtcagcctga	cctgcctggt	480
caaaggcttc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gtcacccgtg	ggttctnnbn	nnbnnbnnbn	bnnbnnbnnb	agcggcaggt	ggnnnbnnbgg	660
gaacgtcttc	tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	720
cctctccctg	tctccgggta	aagcggccgc				750

Figura 14 (SEC ID N° 21) : Fcab04

ggccagccg	gccatggcg	agcccaaatc	ttgtgacaaa	actcacacat	gccaccctg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aaccaagga	120
cacctcatg	atctcccga	cccctgaggt	catatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcggtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	gtctccaaca	aagccctccc	360
agccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacaggtgta	420
caccctgccc	ccatctcggg	atgagctgkm	tkmtkmtcag	gtcagcctga	cctgcctggt	480
caaaggtctc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gctcaccgtg	ggttctkmtk	mtkmtkmtkm	tkmtkmtkmt	agcggcaggt	ggkmtkmtgg	660
gaacgtcttc	tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	720
cctctccctg	tctccgggta	aagcgccgc				750

Figura 15 (SEC ID N° 22) : Fcab05

ggccagccg	gccatggcg	agcccaaatc	ttgtgacaaa	actcacacat	gccaccctg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aaccaagga	120
cacctcatg	atctcccga	cccctgaggt	catatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcggtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	gtctccaaca	aagccctccc	360
agccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacaggtgta	420
caccctgccc	ccatcccgtg	atgagkmtnn	bnnbnnbkmt	gtcagcctga	cctgcctggt	480
caaaggtctc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gctcaccgtg	nbnbnbnbn	nbnbnbnbn	bnnbagggtg	nbnbnbggga	acgtcttctc	660
atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	720
tccgggtaaa	gcgccgc					738

Figura 16 (SEC ID N° 23) : Fcab06

ggccagccg	gccatggcg	agcccaaatc	ttgtgacaaa	actcacacat	gccaccctg	60
cccagcacct	gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcttc	ttccccccaa	aaccaagga	120
cacctcatg	atctcccga	cccctgaggt	catatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	180
agaccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcggtg	gaggtgcata	atgccaagac	240
aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	300
gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcgaag	gtctccaaca	aagccctccc	360
agccccatc	gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	cctcgagaac	cacaggtgta	420
caccctgccc	ccatcccggg	acgagkmtkm	tkmtkmtkmt	gtcagcctga	cctgcctggt	480
caaaggtctc	tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	540
caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	600
gctcaccgtg	kmtkmtkmtk	mtkmtkmtkm	tkmtagggtg	kmtkmtggga	acgtcttctc	660
atgctccgtg	atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	720
tccgggtaaa	gcgccgc					738

Figura 17 (SEC ID N° 72) : vector pYD1

acggattaga	agccgcggag	cggttgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	acgggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgccgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaac	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttctttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggatcgg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	aaaggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600

ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgtcag	taattgcggt	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtgggtgggtg	tggttctggt	gggtgggtggt	840
ctgggtgggtg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtagca	ggatccagtg	tgggtgaatt	ctgcagatat	ccagcacagt	960
ggcggccgct	cgagtctaga	gggcccttcg	aaggtaagcc	tatccctaac	cctctcctcg	1020
gtctcgattc	tacgcgtacc	ggatcatcat	accatcacca	ttgagttaa	accgcgtgat	1080
ctgataacaa	cagtgtagat	gtaacaaaat	cgactttgtt	cccactgtac	tttttagctcg	1140
tacaaaatac	aatatacttt	tcattttctc	gtaaacacaa	tgttttccca	tgtaatatcc	1200
ttttctattt	ttcgttcogt	taccaacttt	acacatactt	tatatagcta	ttcactttcta	1260
tacactaaaa	aactaagaca	attttaattt	tgctgcctgc	catatttcaa	tttgttataa	1320
attcctataa	tttatcctat	tagtagctaa	aaaaagatga	atgtgaatcg	aatcctaaga	1380
gaattgggca	agtgcacaaa	caatacttaa	ataaatacta	ctcagtaata	acctattttct	1440
tagcattttt	gacgaaattt	gctattttgt	tagagtcttt	tacaccattt	gtctccacac	1500
ctccgcttac	atcaacacca	ataacgccat	ttaatctaag	cgcatcacca	acattttctg	1560
gcgtcagtc	accagctaac	ataaaatgta	agctctcggg	gctctcttgc	cttccaaccc	1620
agtcagaaaa	cgagttccaa	tccaaaagtt	cacctgtccc	acctgcttct	gaatcaaa	1680
agggcaataa	cgaatgaggt	ttctgtgaag	ctgcactgag	tagtatgttg	cagctctttg	1740
gaaatacagag	tcttttaata	actggcaaac	cgaggaactc	ttggtattct	tgccacgact	1800
catctccgtg	cagttggacg	atatcaatgc	cgtaatcatt	gaccagagcc	aaaacatcct	1860
ccttaggttg	attacgaaac	acgccaacca	agtatctcgg	agtgcctgaa	ctatttttat	1920
atgctttttac	aagacttgaa	attttccctg	caataaccgg	gtcaattgtt	ctctttctat	1980
ttgggcacaca	tataataccc	agcaagtcag	catcggaatc	tagagcacat	tctgcggcct	2040
ctgtgctctg	caagccgcaa	actttcacca	atggaccaga	actacctgtg	aaattaataa	2100
cagacatact	ccaagctgcc	tttgtgtgct	taatcacgta	tactcacgtg	ctcaatagtc	2160
accaatgccc	tccctcttgg	ccctctcctt	ttcttttttc	gaccgaattt	cttgaagacg	2220
aaagggcctc	gtgatacgcc	tatttttata	gggttaatgtc	atgataataa	tggttttctta	2280
ggacggatcg	cttgccctgta	acttacacgc	gctcgtatc	ttttaatgat	ggaataattt	2340
gggaattttac	tctgtgttta	tttattttta	tggtttgtat	ttggatttta	gaaagtaaat	2400
aaagaaggta	gaagagttac	ggaatgaaga	aaaaaaaata	aacaaagggt	taaaaaattt	2460
caacaaaaag	cgtacttttac	atatatatatt	attagacaag	aaaagcagat	taaatagata	2520
tacattcgat	taacgataag	taaaatgtaa	aatcacagga	ttttcgtgtg	tggctcttcta	2580
cacagacaag	atgaaacaat	tcggcattaa	tacctgagag	caggaagagc	aagataaaaag	2640
gtagtatttg	ttggcgatcc	ccctagagtc	ttttacatct	tcggaaaaca	aaaactattt	2700
tttctttta	ttcttttttt	actttctatt	tttaatttat	atattttatat	taaaaaattt	2760
aaattataat	tatttttata	gcacgtgatg	aaaaggaccc	aggtggcact	tttcggggaa	2820
atgtgcgcg	aacccctatt	tgttttattt	tctaaatata	ttcaaataatg	tatccgctca	2880
tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	2940
aaacatttccg	tgtgcctctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttctc	gtttttgtct	3000
accagaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	caggtgggtt	3060
acatcgaa	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	3120
ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtgttgacg	3180
ccgggcaaga	gcaactcgg	cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	3240
caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgcatgtctg	3300
ccataaccat	gagtataaac	actgcggcca	acttacttct	gacaacgac	ggaggaccga	3360
aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgtttgg	3420
aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacc	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	3480
tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	3540
aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	3600
cggtcggtg	gtttattgct	gataaatctg	gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	3660
ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	cccgatcgt	agttatctac	acgacgggca	3720
gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	gataggtgcc	tactgatta	3780
agcatttggt	actgtcagac	caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	3840
atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	3900
cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	3960
cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccacgcgtac	4020
cagcgggtgg	ttgtttgccc	gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	4080
tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	gcogtagtta	ggccaccact	4140
tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggtcg	4200
ctgccagtg	cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttggaactc	aagacgatag	ttaccggata	4260

aggcgagcg	gtcgggctga	acgggggggtt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	4320
cctacaccga	actgagatac	ctacagcgctg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	4380
ggagaaagcg	ggacaggtat	ccggtaagcg	gcagggtcgg	aacaggagag	cgacagaggg	4440
agcttccagc	gggaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	4500
ttgagcgctg	atttttgtga	tgctcgtcag	gggggcccag	cctatggaaa	aacgccagca	4560
acggcgccctt	tttacgggttc	ctggccctttt	gctggccctt	tgctcacatg	ttctttctctg	4620
cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgcgct	gataccgctc	4680
gccgcagccg	aacgaccgag	cgacgcgagt	cagtgcgaga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	4740
tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttgcc	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	4800
ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgcgcgca	acgcaattaa	tgtgagttac	ctcactcatt	4860
aggcaccacca	ggcttttacac	tttatgcttc	cggctccctat	gttggtgtgga	attgtgagcg	4920
gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagctc	ggaattaacc	4980
ctcactaaag	ggaacaaaag	ctggctagt				5009

Figura 18 (SEC ID N° 73): vector modificado pYD1Nhe

acggattaga	agcgccgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctt	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgccgcgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tgccagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttaa	ctaatacttt	caacattttt	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagttaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggatcgg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtgtt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgcag	taattgcggg	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgt	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccagtg	tggtggaatt	ctgcagatat	ccagcacagt	960
ggcgcccgct	cgagtctaga	ggccctctcg	aaggtaagcc	tatccctaac	cctctcctcg	1020
gtctcgattc	tacgcgtacc	ggatcatcat	accatcacca	ttgagtttaa	acccgctgat	1080
ctgataacaa	cagtgtagat	gtaacaaaat	cgactttggt	cccactgtac	tttttagctcg	1140
tacaaaaaac	aatatacttt	tcattttctc	gtaaacacaa	tgttttccca	tgtaatatcc	1200
ttttctattt	ttcggtccgt	taccaacttt	acacatactt	tatatagcta	ttcactttcta	1260
tactactaaa	aactaagaca	attttaattt	tgctgcctgc	cataatttcaa	tttggtataa	1320
attcctataa	tttatcctat	tagtagctaa	aaaaagatga	atgtgaatcg	aatcctaaga	1380
gaattgggca	agtgcacaaa	caataactta	ataaatacta	ctcagtaata	acctattttct	1440
tagcattttt	gacgaaattt	gctattttgt	tagagtcttt	tacaccattt	gtctccacac	1500
ctccgcttac	ataaacacca	ataacgccat	ttaatctaag	cgcataacca	acattttctg	1560
gcgtcagttc	accagctaac	ataaaatgta	agctctcggt	gctctcttgc	cttccaaacc	1620
agtcagaaat	cgagttccaa	tccaaaagtt	cacctgtccc	acctgcttct	gaatcaaaaca	1680
agggataaaa	cgaatgaggt	ttctgtgaag	ctgcactgag	tagtatgttg	cagttctttt	1740
gaaatacagag	tcttttaata	actggcaaac	cgaggaactc	ttggtattct	tgccacgact	1800
catctccgtg	cagttggacg	atatcaatgc	cgtaatcatt	gaccagagcc	aaaacatcct	1860
ccttaggttg	attacgaaac	acgccaacca	agtatttcgg	agtgcctgaa	ctattttttat	1920
atgcttttac	aagacttgaa	attttccttg	caataaccgg	gtcaattgtt	ctctttctat	1980
tgggcacaca	tataataccc	agcaagtcag	catcggaatc	tagagcacat	tctggggcct	2040
ctgtgctctg	caagccgcaa	actttcacca	atggaccaga	actacctgtg	aaattaataa	2100
cagacatact	ccaagctgcc	tttgtgtgct	taatcacgta	tactcacgtg	ctcaatagtc	2160
accaatgccc	tcctctcttg	ccctctcctt	ttcttttttc	gaccgaattt	cttgaagacg	2220
aaagggcctc	gtgatacgcc	tattttttata	ggttaatgtc	atgataataa	tggtttctta	2280
ggacggatcg	cttgccctgta	acttacacgc	gcctcgtatc	ttttaatgat	ggaataattt	2340
gggaatttac	tctgtgttta	tttattttta	tggtttgtat	ttggatttta	gaaagtaaat	2400
aaagaaggtg	ggaagtttac	ggaatgaaga	aaaaaaaata	aacaaagggt	taaaaaattt	2460
caacaaaaag	cgtactttac	atataatatt	attagacaag	aaaagcagat	taaatagata	2520
tacattcgat	taacgataag	taaaatgtaa	aatcacagga	ttttcgtgtg	tggtcttcta	2580
cacagacaag	atgaaacaat	tcggcattaa	tacctgagag	cagggaagagc	aagataaaaag	2640
gtagtatttg	ttggcgatcc	ccctagagtc	ttttacatct	tcggaaaaca	aaaactattt	2700

tttctttaat	ttcttttttt	actttctatt	tttaatttat	atatttatat	taaaaaat	2760
aaattataat	tatttttata	gcacgtgatg	aaaaggaccc	aggtggcact	tttcggggaa	2820
atgtgcgogg	aacccttatt	tgtttatttt	tctaaatata	ttcaaataatg	tatccgctca	2880
tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	2940
aacatttccg	tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	3000
accagaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	3060
acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	3120
ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctg	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtgttgacg	3180
ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	3240
caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	gcattgacagt	aagagaatta	tgcagtgtctg	3300
ccataaccat	gagtgataac	actgcggcca	acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	3360
aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	3420
aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	3480
tggaacaac	gttcgcgaaa	ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	tcccggaac	3540
aattaataga	ctggatggag	gaggataaag	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	3600
cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	gagcgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	3660
ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	cccgatctgt	agttatctac	acgacgggca	3720
gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	gatagggtgc	tcactgatta	3780
agcatttgta	aactgtcagc	caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	3840
atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	3900
cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	3960
cttgagatcc	ttttttctctg	cgcgtaactc	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	4020
cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	4080
tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	4140
tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	4200
ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	4260
aggcgacagc	gtcgggctga	acggggggtt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	4320
cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	4380
ggagaaaagg	gcagaggtat	ccggtaacgc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	4440
agcttccagg	ggggaacgcc	tggatctctt	atagctctgt	cggtttctgc	cacctctgac	4500
ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag	gggggcccag	cctatggaaa	aacgccagca	4560
acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	4620
cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgaact	gataccgctc	4680
gcccagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	4740
tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	4800
ttcccagactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	acgcaattaa	tgtgagttac	ctcactcatt	4860
aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	cggtctctat	gttgtgtgga	attgtgagcg	4920
gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagctc	ggaattaacc	4980
ctcactaaag	ggaacaaaag	ctggctagt				5009

Figura 19 (SEC ID N° 74): vector pYD1Ink

acggattaga	agccgcccag	cgggtgacag	cctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	acgggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	actttctatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctataactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatat	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttctatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
ttactgattg	gcgcgcggga	tccttcagac	tcgtgcagaat	tcggccgcgt	acttaattaa	660
gtttaaaccc	gctgatctga	taacaacagt	gtagatgtaa	caaaatcgac	tttgttccca	720
ctgtactttt	agctcgtaca	aaatacaata	tacttttcat	ttctccgtaa	acaacatgtt	780
ttcccatgta	atataccttt	ctatttttctg	ttccgttacc	aactttacac	atactttata	840
tagctattca	cttctatata	ctaaaaaact	aagacaattt	taattttgct	gcctgccata	900
tttcaatttg	ttataaattc	ctataattta	tcctattagt	agctaaaaaa	agatgcaatg	960
gaatcgaatc	ctaagagaat	tgggcaagtg	cacaaacaat	acttaataaa	atactactca	1020
gtaataacct	atttcttagc	atttttgacg	aaatttgcta	ttttgttaga	gtcttttaca	1080
ccatttgtct	ccacacctcc	gcttacatca	acaccaataa	cgccatttaa	tctaagcgca	1140

tcaccaacat	tttctggcgt	cagtcaccca	gctaacataa	aatgtaagct	ctcggggctc	1200
tcttgccctc	caacccagtc	agaaatcgag	ttccaatcca	aaagttcacc	tgtccaccct	1260
gcttctgaat	caacaaggg	aataaacgaa	tgaggtttct	gtgaagctgc	actgagtagt	1320
atgttgcaat	cttttgaaa	tacgagtcct	ttaataactg	gcaaaccgag	gaactcttgg	1380
tattcttgcc	acgactcatc	tccgtgcagt	tgagcgatat	caatgccgta	atcattgacc	1440
agagccaaaa	catcctcctt	aggttgatta	cgaaacacgc	caaccaagta	tttcggagtg	1500
cctgaactat	ttttatatgc	ttttacaaga	cttgaaattt	tccttgcaat	aaccgggtca	1560
attgttctct	ttctattggg	cacacatata	ataccagca	agtcagcatc	ggaatctaga	1620
gcacattctg	cggcctctgt	gctctgcaag	ccgcaactt	tcaccaatgg	accagaacta	1680
cctgtgaaat	taataacaga	catactccaa	gctgcctttg	tgtgcttaat	cacgtatact	1740
cacgtgctca	atagtcacca	atgcctccc	tcttgccct	ctccttttct	tttttcgacc	1800
gaatttcttg	aagacgaaa	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttataggtt	aatgtcatga	1860
taataatggg	ttcttaggac	ggatcgcttg	cctgtaactt	acacgcgcct	cgtatctttt	1920
aatgatggaa	taatttggga	atttactctg	tgtttattta	tttttatggt	ttgtatttgg	1980
atttttagaaa	gtaaataaag	aaggtagaag	agtagaagaa	tgaagaaaaa	aaaataaaca	2040
aaggtttaaa	aaatttcaac	aaaaagcgta	ctttacatat	atatttatta	gacaagaaaa	2100
gcagattaaa	tagatataca	ttcgattaac	gataagtaaa	atgtaaaatc	acaggatttt	2160
cgtgtgtggt	cttctacaca	gacaagatga	aacaattcgg	cattaatacc	tgagagcagg	2220
aagagcaaga	taaaaggtag	tatttgttgg	cgatccccct	agagtctttt	acatcttcgg	2280
aaaacaaaaa	ctattttttc	tttaatttct	tttttatatt	tctattttta	atttatatat	2340
ttatatataa	aaattttaat	tataattatt	tttatagcac	gtgatgaaaa	ggaccagggt	2400
ggcacttttc	ggggaatgt	gcgcggaacc	cctatttgtt	tatttttcta	aatacattca	2460
aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	2520
aagagtatga	gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttatct	ccttttttgc	ggcatttttg	2580
cttcctgttt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttg	2640
ggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	2700
cgccccgaag	aacgtttttc	aatgatgagc	actttttaaag	ttctgctatg	tggtcggtta	2760
ttatcccggt	ttgacgcggg	gcaagagcaa	ctcggtcgcc	gcatacacta	ttctcagaat	2820
gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	2880
gaattatgca	gtgctgccat	aaccatgagt	gataaacactg	cggccaactt	acttctgaca	2940
acgatcggag	gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgcaca	acatggggga	tcatgtaact	3000
cgcttgatc	gttgggaacc	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	3060
acgatgcctg	tagcaatggc	acaaacggtg	cgcaaacctat	taactggcga	actacttact	3120
ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	3180
ctgcgctcgg	cccttcgggc	tggctgggtt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	3240
gggtctcgcg	gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctcccg	tatcgtagtt	3300
atctacacga	cgggcagtc	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgctgagata	3360
ggtgcctcac	tgattaagca	ttggttaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatactttat	3420
attgatttaa	aacttcattt	tttaatttaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	3480
ctcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	3540
aagatcaaag	gatcttcttg	agatcccttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	3600
aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtgggttgt	ttgcccgaat	aagagctacc	aactcttttt	3660
ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgag	ataccaata	ctgtccttct	agtgtagccg	3720
tagttaggcc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaact	3780
ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtcgtgtc	ttaccgggtt	ggactcaaga	3840
cgatagttac	cggataaggc	gcagcggtcg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	3900
agcttgagag	gaacgaacct	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	3960
gccacgcttc	ccgaaggagg	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	4020
ggagagcgca	cgagggagct	tccagggggg	aacgcctggt	atctttatag	tcctgtcggg	4080
tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gccgagccta	4140
tggaataaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	4200
cacatgttct	ttctgctgtt	atccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcttttgag	4260
tgagctgata	ccgctcggcg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	4320
gcggaagagc	gcccaatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttgcccgat	tcattaatgc	4380
agctggcagc	acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	4440
agttacctca	ctcattaggc	accccagggt	ttacacttta	tgcttccggc	tcctatgttg	4500
tgtggaattg	tgagcggata	acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	4560
aagctcgga	ttaaccctca	ctaaaggga	caaaagctgg	ctagt		4605

Figura 20 (SEC ID N° 75): vector pYD1mata

acggattaga	agccgcccag	cggttgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgccgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tgggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccgatcgcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
ttactgattg	gcgcgccgga	tccgatgtaa	caaaatcgac	ttgtttccca	ctgtactttt	660
agctcgtaca	aaatacaata	tacttttcat	ttctccgtaa	acaacatggt	ttcccatgta	720
atatccctttt	ctatttttctg	ttccgtttacc	aacttttacac	atactttata	tagctattta	780
cttctataca	ctaaaaaact	aagacaattt	taattttgct	gcctgccata	tttcaatttg	840
ttataaatct	ctataattta	tcctattagt	agctaaaaaa	agatgaatgt	gaatcgaatc	900
ctaagagaat	tgctgcagaa	ttcgcccgcg	tacttaattt	agttaaacc	cgctgatctg	960
ataacaacag	tgtagatgta	acaaaatcga	ctttgttccc	actgtacttt	tagctcgtac	1020
aaaaatacaat	atacttttca	ttctccgta	aacaacatgt	tttcccatgt	aatatccctt	1080
tctatttttc	gttccgtttac	caactttaca	catactttat	atagctattc	acttctatac	1140
actaaaaaac	taagacaatt	ttaattttgc	tgccgtgcat	atttcaattt	gttataaatt	1200
cctataattt	atcctattag	tagctaaaaa	aagatgaatg	tgaatcgaat	cctaagagaa	1260
ttgggcaagt	gcacaaacaa	tacttaataa	aataactact	agtaataacc	tatttcttag	1320
catttttgac	gaaatttgct	attttggttag	agtcttttac	accatttgct	tcacacacct	1380
cgcttacatc	aacaccaata	acgccattta	atctaagcgc	atcaccaaca	ttttctggcg	1440
tcagtcacc	agctaacata	aaatgtgaagc	tctcggggct	ctcttgccct	ccaacccagt	1500
cagaaatcga	gttccaatcc	aaaaagtccac	ctgtcccacc	tgcttctgaa	tcaaaccaagg	1560
gaataaacga	atgaggtttc	tgtgaagctg	cactgagtag	tatgttgacg	tcttttgga	1620
atcagagctc	tttaataact	ggcaaaccca	ggaactcttg	gtattcttgc	cacgactcat	1680
ctccgtgcag	ttggacgata	tcaatgccgt	aatcattgac	cagagccaaa	acatccctct	1740
taggttgatt	acgaaacacg	ccaaccaagt	atttcggagt	gcctgaacta	tttttatatg	1800
cttttacaa	acttgaaatt	ttccttgcaa	taaccgggtc	aattgttctc	tttctatttg	1860
gcacacatat	aatacccgac	aagtcagcat	cggaatctag	agcacattct	gcgccctctg	1920
tgctctgcaa	gccgcaaac	ttcaccaatg	gaccagaact	acctgtgaaa	ttataaacag	1980
acatactcca	agctgccttt	gtgtgcttaa	tcacgtatac	tcacgtgctc	aatagtcacc	2040
aatgccctcc	ctcttgcccc	ttctcttttc	ttttttcgac	cgaatttctt	gaagacgaaa	2100
gggcctcgctg	atcgcctat	ttttataggt	taatgtcatg	ataataatgg	tttcttagga	2160
cggtatcgctt	gcctgtaact	tacacgcgcc	tcgtatcttt	taatgatgga	ataatttggtg	2220
aatttactct	gtgtttattt	atttttatgt	tttgtatttg	gatttttagaa	agtaaaataa	2280
gaaggtagaa	agtttacgga	atgaagaaaa	aaaaataaac	aaaggtttaa	aaaaatttcaa	2340
caaaaagcgt	actttacata	tatatattat	agacaagaaa	agcagattaa	atagatatatac	2400
atcgatttaa	cgataagtaa	aatgtaaaaa	cacaggattt	tcgtgtgtgg	tcttctacac	2460
agacaagatg	aaacaattcg	gcattaatac	ctgagagcag	gaagagcaag	ataaaaggta	2520
gtatttggtg	gcgatcccc	tagagtcttt	tacatcttcg	gaaaacaaaa	actatttttt	2580
ctttaatttc	tttttttact	ttctattttt	aatttatata	tttatattaa	aaaattttaa	2640
ttataattat	ttttatagca	cgtgatgaaa	aggaccagg	tggcactttt	cggggaaatg	2700
tgccggaac	ccctatttgt	ttatttttct	aaatacatte	aaatatgtat	ccgctcatga	2760
gacaataacc	ctgataaatg	cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	2820
atttccgtgt	cgcccttatt	cccttttttg	cgccattttg	ccttccgtgt	tttgctcacc	2880
cagaaacgct	ggtgaaagta	aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	2940
tcgaactgga	tctcaacagc	ggtaagatcc	ttgagagtgt	tcgccccgaa	gaacgttttc	3000
caatgatgag	cactttttaa	gttctgctat	gtggcgcggt	attatcccgt	gttgacgccg	3060
ggcaagagca	actcggtcgc	cgcatacact	attctcagaa	tgacttggtt	gagtactcac	3120
cagtcacaga	aaagcatctt	acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgtgccca	3180
taaccatgag	tgataacact	gcggccaact	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	3240
agctaaccgc	ttttttgcac	aacatggggg	atcatgtaac	tcgccttgat	cgttggaac	3300
cggagctgaa	tgaagccata	ccaaacgacg	agcgtgacac	cacgatgcct	gtagcaatgg	3360
caacaacgtt	gcgcaaaacta	ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	3420
taatagactg	gatggaggcg	gataaagtgt	caggaccact	tctgcgctcg	gcccttccgg	3480
ctggctggtt	tattgctgat	aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	3540
cagcactggg	gccagatggt	aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acgggcagtc	3600
aggcaactat	ggatgaacga	aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	3660

attggttaact	gtcagaccaa	gtttactcat	atatacttta	gattgattta	aaacttcatt	3720
tttaatttaa	aaggatctag	gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	3780
aacgtgagtt	ttcgttccac	tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	ggatcttctt	3840
gagatccttt	ttttctgcgc	gtaatctgct	gcttgcaaac	aaaaaaacca	ccgctaccag	3900
cgggtggtttg	tttgccggat	caagagctac	caactctttt	tccgaaggta	actggcttca	3960
gcagagcgca	gataccaaat	actgtccttc	tagtgtagcc	gtagttaggc	caccacttca	4020
agaactctgt	agcaccgcct	acatacctcg	ctctgctaatt	cctgttacca	gtggctgctg	4080
ccagtggcga	taagtcgtgt	cttaccgggt	tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	4140
cgcagcggtc	gggctgaacg	gggggttcgt	gcacacagcc	cagcttggag	cgaacgacct	4200
acaccgaact	gagataccta	cagcgtgagc	attgagaaa	cgccacgctt	cccgaaggga	4260
gaaaggcgga	caggtatccg	gtaagcgga	gggtcggaac	aggagagcgc	acgagggagc	4320
ttccaggggg	gaacgcctgg	tatctttata	gtcctgtcgg	gtttcgccac	ctctgacttg	4380
agcgctcgatt	tttgtgatgc	tcgtcagggg	ggccgagcct	atggaaaaac	gccagcaacg	4440
cggccttttt	acggttcctg	gccttttgc	ggccttttgc	tcacatgttc	tttctctgct	4500
tatcccctga	ttctgtggat	aaccgtatta	ccgcctttga	gtgagctgat	accgctcgcc	4560
gcagccgaac	gacgagcgc	agcgagtcag	tgagcgagga	agcggaagag	cgcccaatac	4620
gcaaacggcc	tctcccgcg	cgttgccga	ttcattaatg	cagctggcac	gacaggtttc	4680
ccgactggaa	agcgggcagt	gagcgcaacg	caattaatgt	gagttacctc	actcatttag	4740
caccccaggc	tttacacttt	atgcttcggg	ctcctatgtt	gtgtggaatt	gtgagcggat	4800
aacaatttca	cacaggaac	agctatgacc	atgattacgc	caagctcgga	attaaccctc	4860
actaaaggga	acaaaagctg	gctagt				4886

Figura 21 (SEC ID N° 76) : vector pYD1gal

acggattaga	agccgcgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgctg	60
cctcgctctc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgccgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaatataca	accataggat	gataatgcga	240
ttagttttttt	agccttattt	ctggggtaat	taattcagca	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccgatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgta	ttgtctcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
ttactgattg	gcgcgcgga	tcgatgtaa	caaaatcgac	ttgttccca	ctgtactttt	660
agctcgta	aaatacaata	tacttttcat	ttctccgtaa	acaacatgtt	ttcccatgta	720
atatcctttt	ctatttttgc	ttccgttacc	aacttttacac	atactttata	tagctatttca	780
cttctatata	ctaaaaaact	aagacaattt	taattttgct	gcctgccata	tttcaatttg	840
ttataaattc	ctataattta	tcctattagt	agctaaaaaa	agatgaatgt	gaatcgaatc	900
ctaagagaat	tgctgcagaa	ttcacggatt	agaagccg	gagcgggtga	cagccctccg	960
aaggaagact	ctcctccgtg	cgtcctcg	ttcaccgg	gcgttctga	aacgcagatg	1020
tgctcgcgc	cgcactgctc	cgaacaataa	agattctaca	atactagctt	ttatgggttat	1080
gaagaggaaa	aattggcagt	aacctggccc	cacaaacctt	caaatgaacg	aatcaaatata	1140
acaaccatag	gatgataatg	cgattagttt	tttagcctta	tttctggggt	aattaatcag	1200
cgaagcgatg	atttttgatc	tattaacaga	tataataatg	caaaaactgc	ataaccactt	1260
taactaatat	tttcaacatt	ttcggtttgt	attacttctt	attcaaatgt	aataaaagta	1320
tcaacaaaaa	attgttaata	tacctctata	ctttaacgtc	aaggagaaaa	aaccccggtat	1380
cggactacta	gcagctgtaa	tacgactcac	tatagggaat	attaagctaa	ttctacttca	1440
tacatttttca	attaagatgc	agttacttcg	ctgtttttca	atattttctg	ttattgcttc	1500
agtttttagca	caggaactga	caactatatg	cgagcaaatc	ccctcaccaa	ctttagaatc	1560
gacgcgctac	ttttgtcaa	cgactactat	tttgcccaac	gggaaggcaa	tgcaaggagt	1620
ttttgaatat	tacaaatcag	taacgtttgt	cagtaattgc	ggttctcacc	cctcaacaac	1680
tagcaaaagg	agccccataa	acacacagta	tgtttttaag	cttctgcagg	ctagtgggtg	1740
tggtgggtct	gggtgggtg	gttctgggtg	tggtgggtct	gctagcatga	ctgggtggcca	1800
gcaaggccta	attctgatgc	ggccgcacat	catcaccatc	accattgatt	aattaagttt	1860
aaacccgctg	atctgataac	aacagtgtag	atgtaacaaa	atcgactttg	ttcccactgt	1920
acttttagct	cgtacaaaat	acaatatact	tttcattttc	ccgtaaacaa	catgttttcc	1980
catgtaatat	ccttttctat	ttttcgttcc	gttaccact	ttacacatac	tttatatagc	2040
tattcacttc	tatacactaa	aaaactaaga	caattttaat	tttgcctgct	gccatatttc	2100
aatttggttat	aaattcctat	aatttatcct	attagtagct	aaaaaaagat	gaatgtgaat	2160
cgaatcctaa	gagaattggg	caagtgcaca	aacaatactt	aaataaatat	tactcagtaa	2220

taacctat	cttagcatt	ttgacgaa	ttgctat	gttagagt	tttacacc	2280
ttgtctcc	acctccg	acatcaac	caataac	atttaata	agcgcatc	2340
caacattt	tggcgtag	ccaccagc	acataaaa	taagctct	gggctctc	2400
gccttcca	ccagtcaga	atcgagtt	aatccaaa	ttcacctg	ccacctgt	2460
ctgaatcaa	caagggaat	aacgaatg	gtttctgt	agctgcac	agtagtat	2520
tgcagtc	tggaaatac	agtccttta	taactggca	accgagga	tcttggtat	2580
cttgccacg	ctcatctcc	tgcagttga	cgatatca	gccgtaac	ttgaccag	2640
ccaaaacat	ctccttag	tgattacga	acacgccac	caagtatt	ggagtgc	2700
aactat	atatgct	acaagact	aaat	tgcaataa	gggtcaat	2760
ttctct	attgggcac	catataat	ccagcaag	agcatcgg	tctagagc	2820
attctgcgg	ctctgtg	tgcaagcc	aaactttc	caatggac	gaactacc	2880
tgaataat	aacagacat	ctccaagc	cctttgtg	cttaatac	tatactac	2940
tgctcaat	tcaccaat	cctccctc	ggccctct	tttctttt	tcgaccga	3000
ttcttgaag	cgaaaggcc	tcgtgata	cctat	taggtta	tcatgata	3060
aatggttt	taggacgat	cgcttgcc	taacttac	gcgcctcg	tctttta	3120
atggaata	ttgggaatt	actctgtg	tatttatt	tatgtttg	atttgga	3180
tagaaagta	ataaagaag	tagaagag	acggaatg	gaaaaaaaa	taaacaa	3240
tttaaaaa	ttcaacaaa	agcgta	acatatata	ttattagac	agaaaagc	3300
attaaatag	tatacat	attaacga	agtaaaat	aaaatcac	gattttc	3360
tgtggtct	tacacagac	agatgaa	attcggc	aatacctg	agcagga	3420
gcaagata	aggtagt	tgttggcg	ccccctag	tcttttac	cttcggaa	3480
caaaaact	ttttcttt	atttcttt	ttactttc	ttttta	atata	3540
attaaaaa	ttaaattat	attat	tagcacgt	tgaaaagg	ccaggtgg	3600
cttttcggg	aaatgtgc	ggaacc	tttgttt	tttctaa	cattcaa	3660
tgatccg	catgagac	taaccctg	aaatgctt	ataatatt	aaaagga	3720
gtatgagt	ctaacatt	cgtgtgcc	ttattcc	ttttgcgg	ttttgc	3780
ctgttttgc	tcaccagaa	acgctggt	aagtaaa	tgctgaag	cagttggg	3840
cacgagtgg	ttacatcga	ctggatct	acagcggt	gatccttg	agttttcg	3900
ccgaagaac	ttttccaat	atgagcatt	ttaaagtt	gctatgtg	gcggtatt	3960
cccggttg	cgccgggca	gagcaact	gtcgccgc	acactatt	cagaatga	4020
tgtttgagt	ctcaccagt	acagaaa	atcttacg	tgcatgac	gtaagaga	4080
tatgcagt	tgccataac	atgagtga	acactg	caacttac	ctgacaac	4140
tcggaggac	gaaggagc	accgcttt	tgcaaca	gggggatc	gtaactcg	4200
ttgatcgt	ggaaccgg	ctgaatga	ccataccaa	cgacgagc	gacaccac	4260
tcctgtgag	aatggcaac	acgttg	aaactatta	tgccgaac	cttactct	4320
cttcccgga	acaatta	gactggat	aggcgata	agttgcag	ccacttct	4380
gctcgcc	tccggctg	tggtttat	ctgataaa	tgagccgg	gagcgtgg	4440
ctcgcggt	cattgcag	ctggggcc	atggtaag	ctcccgta	gtagttat	4500
acacgacgg	cagtcagg	actatgga	aacgaaat	acagatcg	gagatagg	4560
cctcactgt	taagcattg	taactgtc	accaagtt	ctcatata	ctttagatt	4620
atttaaa	tcattttta	tttaaa	tctaggtg	gatccttt	gataatct	4680
tgaccaaa	cccttaac	gagtttct	tccactga	gtcagac	gtagaaa	4740
tcaaaggat	ttcttgag	cctttttt	tgccgta	ctgctgct	caaacaaa	4800
aaccaccg	accagcggt	gtttgttg	cggatca	gctacca	ctttttcc	4860
aggtaactg	cttcagcag	gcgcagata	caaatact	ccttctagt	tagccgtag	4920
taggccacca	cttcaaga	tctgtagc	cgctacata	cctcgctc	ctaactct	4980
taccagtgg	tgtgccagt	ggcgata	cgtgtctt	cggttgga	tcaagacg	5040
agtaccgga	taaggcgag	cggtcggt	gaacgggg	ttcgtgca	cagcccag	5100
tgagcgga	gacctacac	gaactgag	acctacag	tgagcatt	gaaagcg	5160
cgcttcccg	aggagaaa	gcggacag	atccggt	cgccaggt	ggaacagg	5220
agcgacag	ggagctcca	gggggga	cctggtat	ttatagtc	gtcgggtt	5280
gccacctct	acttgagc	cgattttt	gatgctc	aggggggc	agcctatg	5340
aaaacgcc	caacgcgg	tttttacg	tcctggc	ttgctggc	tttgctca	5400
tggtcttt	tgcgttat	cctgattc	tgataacc	tattaccg	tttgagtg	5460
ctgataccg	tcgccgag	cgaacgac	agcgagcg	gtcagtg	gaggaagc	5520
aagagcgcc	aatacgcaa	ccgcctct	ccgcgcgt	gccattca	taatgcag	5580
ggcacgac	gtttcccg	tgaaagcg	gcagtgag	caacgca	aatgtgag	5640
acctcact	ttaggcacc	caggtttt	actttatg	tcgggtct	atgttgtg	5700
gaattgtg	cggataaca	tttcacac	gaaacag	tgaccatg	tacgcca	5760
tcggaatta	ccctcact	agggaaca	agctggct	t		5801

Figura 22 (SEC ID N° 77) : 4D5H

ggccagcaag	gccaagaggt	tcaactagtg	gagtcctggcg	gtggcctggg	gcagccaggg	60
ggctcactcc	gtttgtcctg	tgcagcttct	ggcttcaaca	ttaaagacac	ctatatacac	120
tgggtgcgtc	aggccccggg	taaggccctg	gaatgggttg	caaggattta	tcctacgaat	180
ggttatacta	gatatgccga	tagcgtcaag	ggcgttttca	ctataagcgc	agacacatcc	240
aaaaacacag	cctacctgca	gatgaacagc	ctgcgtgctg	aggacactgc	cgtctattat	300
tgttctagat	ggggagggga	cggcttctat	gctatggact	actggggtca	aggaaccctg	360
gtcaccgtct	cctcggttag	caccaagggc	cccagcgtgt	tccctctggc	ccccagctcc	420
aagagcacct	ccggcgccac	cgccgcccctg	ggctgcctgg	tgaaggatta	cttcccagag	480
ccgctgaccg	tgagctggaa	cagcgccgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	ctttcccggc	540
gtgctgcagt	ccagcgccct	gtactccctg	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	cagcagcagc	600
ctgggacccc	agacctacat	ctgcaatgtg	aaccacaagc	ccagcaatac	caaggtggat	660
aagaaggtgg	agcccaagag	ctgcgcggcc	gc			692

Figura 23 (SEC ID N° 78) : 4D5L

ccatggcgga	tatccagatg	accagtcctc	cgagctccct	gtccgcctct	gtgggcgata	60
gggtcaccat	cacctgccgt	gccagtcagg	atgtgaatac	tgctgtagcc	tggtatcaac	120
agaaccagg	aaaagctccg	aaactactga	tttactcggc	atccttcttc	tactctggag	180
tcctttctcg	cttctctgga	tccagatctg	ggacggattt	cactctgacc	atcagcagtc	240
tgcagccgga	agacttcgca	acttattact	gtcagcaaca	ttatactact	cctcccacgt	300
tcggagcagg	taccaagggtg	gagatcaaac	gtacgggtggc	ggcgccatct	gtcttcatct	360
tccgcctatc	tgtgagcag	cttaagtctg	gaactgcctc	tgttgtgtgc	ctgctgaata	420
acttctatcc	cagagaggcc	aaagtacagt	ggaagggtgga	taacgccttc	caatcgggta	480
actccaggga	gagtgacaca	gagcaggaca	gcaaggacag	cacctacagc	ctcagcagca	540
ccctgacgct	gagcaaaagc	gactacgaga	aacacaaagt	ctacgcctgc	gaagtcaccc	600
atcagggcct	gagctcgccc	gtcacaaaaga	gcttcaacag	gggagagtgt	tgaggcgcg	660
c						661

Figura 24 (SEC ID N° 79) : vector pYD4D5hc

acggattaga	agccgcccag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgccgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tgccagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagttaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	aggaatattt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
ttactgattg	gcgcgcccga	tccgatgtaa	caaaatcgac	tttgttccca	ctgtactttt	660
agctcgtaca	aaatacaata	tacttttcat	ttctccgtaa	acaacatgtt	ttcccattgt	720
atatcctttt	ctatttttctg	ttccgttacc	aacttttacac	atactttata	tagctatttca	780
cttctataca	ctaaaaaact	aagacaattt	taatttttgt	gcctgccata	tttcaatttg	840
ttataaattc	ctataattta	tcctattagt	agatgaaaaa	agatgaatgt	gaatcgaatc	900
ctaagagaat	tgctgcagaa	ttcacggatt	agaagccgcc	gagcgggtga	cagccctccg	960
aaggaagact	ctcctccgtg	cgtcctcgtc	ttcacccgtc	gcgttcctga	aacgcagatg	1020
tgctcgcgcg	cgcactgctc	cgaacaataa	agattctaca	atactagctt	ttatggttat	1080
gaagaggaaa	aattggcagt	aacctggccc	cacaaacctt	caaatgaacg	aatacaatta	1140
acaaccatag	gatgataatg	cgattagttt	tttagcctta	tttctggggg	aattaatcag	1200
cgaagcgatg	atttttgatc	tattaacaga	tatataaatg	caaaaactgc	ataaaccatt	1260
taactaatac	tttcaacatt	ttcggtttgt	attacttctt	attcaaatgt	aataaaaagta	1320
tcaacaaaaa	attgttaata	tacctgtata	cttttaacgtc	aaggagaaaa	aacccccgat	1380
cggactacta	gcagctgtaa	tacgactcac	tatagggaat	attaagctaa	ttctacttca	1440
tacattttca	attaagatgc	agttacttgc	ctgtttttca	atattttctg	ttattgtctc	1500
agtttttagca	caggaaactga	caactatatg	cgagcaaatc	ccctcaccaa	ctttagaatc	1560
gacgccgtac	tcctttgtcaa	cgactactat	tttgcccaac	gggaaggcaa	tgcaaggagt	1620
ttttgaatat	tacaaatcag	taacgtttgt	cagtaattgc	ggttctcacc	cctcaacaac	1680

ES 2 490 192 T3

tagcaaaggc	agccccataa	acacacagta	tgtttttaag	cttctgcagg	ctagtgggtg	1740
tggtgggttct	ggtgggtggg	gttctgggtg	tggtgggttct	gctagcatga	ctggtggcca	1800
gcaaggccaa	ggttctgagg	ttcaactagt	ggagtctggc	ggtggcctgg	tgagccagg	1860
gggtcactc	cgtttgcct	gtgcagcttc	tggttcaac	attaaagaca	cctatataca	1920
ctgggtgcgt	caggccccgg	gtaaggccct	ggaatgggtt	gcaaggattt	atcctacgaa	1980
tggttatact	agatatgccg	atagcgtcaa	gggccgtttc	actataagcg	cagacacatc	2040
caaaaaacaca	gcctacctgc	agatgaacag	cctgcgtgct	gaggacactg	ccgtctatta	2100
ttgttctaga	tggtggagg	acggcttcta	tgctatggac	tactggggtc	aaggaaccct	2160
ggtcacgcgt	tcctcggcta	gcaccaagg	ccccagcgtg	ttccctctgg	ccccagctc	2220
caagagcacc	tccggcggca	ccgcccct	gggtgcctg	gtgaaggatt	acttcccaga	2280
gcccgtgacc	gtgagctgga	acagcggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	cctttccgc	2340
cgtgctgcag	tccagcggcc	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	ccagcagcag	2400
cctgggcacc	cagacctaca	tctgcaatgt	gaaccacaag	cccagcaata	ccaaggtgga	2460
taagaagggtg	gagcccaaga	gctgcgcggc	cgacatcat	caccatcacc	attgattaat	2520
taagtttaaa	cccgtgatc	tgataacaac	agtgtagatg	taacaaaatc	gactttgttc	2580
ccactgtact	tttagctcgt	acaaaatata	atatactttt	catttctccg	taaacacat	2640
gttttcccat	gtaatatcct	tttctatttt	tcgttccgtt	accaaactta	cacatacttt	2700
atatagctat	tcacttctat	acactaaaaa	actaaagcaa	ttttaatttt	gctgcctgcc	2760
atatttcaat	ttgttataaa	ttcctataat	ttatcctatt	agtagctaaa	aaaagatgaa	2820
tgtgaatcga	atcctaagag	aattgggcaa	gtgcacaaac	aatacttaaa	taaatactac	2880
tcagtaataa	cctatttctt	agcatttttg	acgaatttg	ctattttgtt	agagtctttt	2940
acaccatttg	tctccacacc	tccgcttaca	tcaacaccaa	taacgccatt	taatctaagc	3000
gcatacccaa	cattttctgg	cgctcagtcca	ccagctaaca	taaaatgtaa	gctctcggg	3060
ctctcttgcc	ttccaaccca	gtcagaaatc	gagttccaat	ccaaaagttc	acctgtccca	3120
cctgcttctg	aatcaaacaa	gggaataaac	gaatgaggtt	tctgtgaagc	tgactgagt	3180
agtatgttgc	agttcttttg	aaatacagag	cttttaataa	ctggcaaac	gaggaactct	3240
tggtattctt	gccacgactc	atctccgtgc	agttggacga	tatcaatgcc	gtaatcattg	3300
accagagcca	aaacatcctc	cttaggttga	ttacgaaaca	cgccaacca	gtatttcgga	3360
gtgcctgaac	tatttttata	tgcttttaca	agacttgaaa	ttttccttgc	aataaccggg	3420
tcaattgttc	tctttctatt	gggcacacat	ataataccca	gcaagtgcgc	atcggaatct	3480
agagcacatt	ctgcggcctc	tgtgctctgc	aagccgcaaa	ctttcaccaa	tggaaccagaa	3540
ctacctgtga	aattaataac	agacatactc	caagctgcct	ttgtgtgctt	aatcacgtat	3600
actcacgtgc	tcaatagtca	ccaatgccct	ccctcttggc	cctctccttt	tctttttctg	3660
accgaatttc	ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	attttttatag	gttaatgtca	3720
tgataataat	ggtttcttag	gacggatcgc	ttgcctgtaa	cttacacgcg	cctcgtatct	3780
tttaatgatg	gaataatttg	ggaatttact	ctgtgtttat	ttatttttat	gttttgtatt	3840
tggtttttag	aaagttaaata	aagaaggtag	aagagttacg	gaatgaagaa	aaaaaaataa	3900
acaaagggtt	aaaaaatttc	aacaaaaagc	gtactttaca	tatatattta	ttagacaaga	3960
aaagcagatt	aaatagatat	acattcgtat	aacgataagt	aaaatgtaaa	atcacaggat	4020
tttcgtgtgt	ggtcttctac	acagacaaga	tgaacaatt	cggcattaat	acctgagagc	4080
aggaagagca	agataaaaag	tagtatttgt	tggcgatccc	cctagagtct	tttacactct	4140
cggaaaaacaa	aaactatttt	ttctttaatt	ctttttttta	ctttctattt	tttaattata	4200
tatttatatt	aaaaaattta	aattataatt	attttttatag	cacgtgatga	aaaggaccca	4260
ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	accctatttt	gtttattttt	ctaaatacat	4320
tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	4380
aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccttta	ttcccttttt	tgcggcattt	4440
tgcccttctg	tttttgcctc	cccagaaacg	ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	4500
ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	gatctcaaca	gcggtaagat	ccttgagagt	4560
tttcgccccg	agaacggtt	tccaatgatg	agcactttta	aagttctgct	atgtggcgcg	4620
gtattatccc	gtgttgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	gcgcataca	ctattctcag	4680
aatgacttgg	ttgagtactc	accagtca	gaaaagcatt	ttacggatgg	catgacagta	4740
agagaattat	gcagtgtctg	cataaccatg	agtataaca	ctgcggccaa	cttacttctg	4800
acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	4860
actgccttgc	atcgttggga	accggagctg	aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	4920
accagatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	4980
actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	tggtgggagg	cggataaagt	tgacaggacca	5040
cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	agccgggtgag	5100
cgtgggtctc	gcgttatcat	tgagcactg	ggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	5160
gttatctaca	cgacgggcag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgtgtgag	5220
ataggtgcct	cactgattaa	gcatttgtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	5280
tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	5340

aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgtg	5400
gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	5460
acaaaaaac	caccgctacc	agcgggtggt	tggttgccgg	atcaagagct	accaactctt	5520
tttccgaagg	taactggcct	cagcagagcg	cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	5580
ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	gtagcaccgc	ctacatacct	cgctctgcta	5640
atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtgcc	gataagtcgt	gtcttacccg	gttgactca	5700
agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	tcgggctgaa	cgggggggtc	gtgcacacag	5760
cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgtga	gcattgagaa	5820
agcggccacg	ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggatc	cggtaagcgg	cagggtcgga	5880
acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	gggaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	5940
gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	tttttctgat	gctcgtcagg	ggggccgagc	6000
ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcgcccttt	ttacgggtcc	tgcccttttg	ctggcccttt	6060
gctcacatgt	tctttcctgc	gttatccctt	gattctgtgg	ataaccgtat	taccgccttt	6120
gagtgaagct	ataccgctcg	ccgcagccga	acgaccgagc	gcagcagagc	agtgaagcag	6180
gaagcggaa	agcgcccaat	acgcaaaccc	ccctccccc	cgcttgccg	gattcattaa	6240
tgacagctgg	acgacaggtt	tcccagactg	aaagcgggca	gtgagcgcaa	cgcaattaat	6300
gtgagttacc	tactcatta	ggcaccaccg	gctttacact	ttatgcttcc	ggctcctatg	6360
ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	6420
gccaagctcg	gaattaaccc	tcactaaagg	gaacaaaagg	tggttagt		6480

Figura 25 (SEC ID N° 80): 4D5hp

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY	60
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYANDYW	GQGTLVTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGLCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSC		223

Figura 26 (SEC ID N° 81) : vector pYD4D5hl

acggattaga	agccgcccag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtccgc	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccc	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagttaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	atcttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
cggatatcca	gatgaccacg	tccccgagct	ccctgtccgc	ctctgtgggc	gatagggtca	660
ccatcacctg	ccgtgccagt	caggatgtga	atactgctgt	agcctgggat	caacagaaac	720
caggaaaagc	tccgaaacta	ctgatttact	cggcatcctt	cctctactct	ggagtccttt	780
ctcgtctctc	tggtatccaga	tctgggacgg	atttcaactc	gaccatcagc	agtcgtcagc	840
cggaaagact	cgcaacttat	tactgtcagc	aacattatac	tactcctccc	acgttcggac	900
agggtaccaa	ggtggagatc	aaacgtacgg	tggcgccgc	atctgtcttc	atcttcccgc	960
catctgtaga	cagctttaag	tctggaaact	ccctgtttgt	gtgcctgtcg	aataacttct	1020
atcccagaga	ggccaaagta	cagtgggaag	tggtatacgc	cctccaatcg	ggtaactccc	1080
aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	agcaccttga	1140
cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	acccatcagg	1200
gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgttgaggc	gcgccggatc	1260
cgtatgaaca	aaatcgactt	tgttcccact	gtacttttag	ctcgtacaaa	atacaatata	1320
cttttctatt	ctccgtaaac	aacatgtttt	cccatgtaat	atccttttct	attttctggt	1380
ccgttaccaa	ctttacacat	actttatata	gctattcact	tctatacact	aaaaaactaa	1440
gacaatttta	attttgctgc	ctgccatatt	tcaatttggt	ataaattcct	ataatttatt	1500
ctattagtag	ctaaaaaaag	atgaatgtga	atcgaaatcct	aagagaattg	ctgcagaatt	1560
cacggattag	aagccgcccga	gcgggtgaca	gccctccgaa	ggaagactct	cctccgtgcg	1620
tctcgtctct	caccggtcgc	gttccctgaa	cgcagatgtg	cctcgcgcgc	cactgctccg	1680
aacaataaag	attctacaat	actagctttt	atggttatga	agaggaaaaa	ttggcagtaa	1740
cctggcccca	caaacccttca	aatgaacgaa	tcaaattaac	aaccatagga	tgataatgcg	1800
attagttttt	tagccttatt	tctggggtaa	ttaatcagcg	aagcagatgat	ttttgatcta	1860

ES 2 490 192 T3

ttaacagata	tataaatgca	aaaactgcat	aaccacttta	actaataactt	tcaacattttt	1920
cggtttgtat	tactttcttat	tcaaatgttaa	taaaagtatc	aacaaaaaat	tggttaataata	1980
cctctataact	ttaacgtcaa	ggagaaaaaa	ccccggatcg	gactactagc	agctgtaata	2040
cgactcacta	tagggaatat	taagctaatt	ctacttcata	catttttcaat	taagatgcag	2100
ttacttgcgt	gttttttcaat	attttctgtt	attgcttcag	tttttagcaca	ggaactgaca	2160
actatatgcg	agcaaatccc	ctcaccaact	ttagaatcga	cgcggtactc	tttgtcaacg	2220
actactattt	tgGCCAACGg	gaaggcaatg	caaggagttt	ttgaatatta	caaatcagta	2280
acgtttgtca	gtaattgcgg	ttctcaccoc	tcaacaacta	gcaaaggcag	ccccataaac	2340
acacagtatg	tttttaagct	tctgcaggct	agtgggtggt	gtggttctgg	tggtgggtggt	2400
tctgggtggt	gtggttctgc	tagcatgact	ggtggccagc	aaggccaaga	ggttcaacta	2460
gtggagtctg	gcggtggcct	ggtgcagcca	gggggtcac	tccgtttgtc	ctgtgcagct	2520
tctggcttca	acattaaaga	cacctatata	cactgggtgc	gtcaggcccc	gggtaagggc	2580
ctggaatggg	ttgcaaggat	ttatcctacg	aatggttata	ctagatatgc	cgatagcgtc	2640
aagggccggt	tcactataag	cgcagacaca	tccaaaaaca	cagcctacct	gcagatgaac	2700
agcctgcgtg	ctgaggacac	tgccgtctat	tattgttcta	gatggggagg	ggacggcttc	2760
tatgctatgg	actactgggg	tcaaggaacc	ctggtcaccg	tctcctcggc	tagcaccaag	2820
ggccccagcg	tggttccctct	ggccccagc	tccaagagca	cctccggcgg	caccgccggc	2880
ctgggctgcc	tggtgaaggga	ttacttccca	gagcccgta	ccgtgagctg	gaacagcgcg	2940
gcctgagcca	gcggcgtgca	cacctttccc	gcggtgctgc	agtccagcgg	cctgtactcc	3000
ctgagcagct	tggtgaccgt	gcccagcagc	agcctgggca	cccagacctc	catctgcaat	3060
gtgaaccaca	agcccagcaa	taccaagggt	gataagaagg	tggagcccaa	gagctgcgcg	3120
gccgcacatc	atcaccatca	ccattgatta	attaagttta	aacccgctga	tctgataaca	3180
acagtgtaga	tgtaacaaaa	tgcactttgt	tcccactgta	cttttagctc	gtacaaaaata	3240
caatataact	ttcattttctc	cgtaaacaac	atgttttccc	atgtaatatc	cttttctatt	3300
tttcggtccg	ttaccaactt	tacacatact	ttatatagct	attcacttct	atacactaaa	3360
aaactaagac	aatttttaatt	ttgctgcctg	ccatatttca	atttgtttata	aattcctata	3420
atttatocta	ttagtagcta	aaaaaagatg	aatgtgaatc	gaatcctaag	agaattgggc	3480
aagtgcacaa	acaatactta	aataaatact	actcagtaat	aacctatttc	ttagcattttt	3540
tgacgaaatt	tgctattttg	ttagagtctt	ttacaccatt	tgtctccaca	cctccgctta	3600
catcaacacc	aataacgcca	tttaactcaa	gcgcataccc	aacattttct	ggcgtgcgtc	3660
caccagctaa	cataaaatgt	aagctctcgg	ggctctcttg	ccttccaacc	cagtcagaaa	3720
tcgagttcca	atccaaaagt	tcacctgtcc	cacctgcttc	tgaatcaaac	aagggaaata	3780
acgaatgagg	tttctgtgaa	gctgcactga	gtagtatggt	gcagtccttt	ggaaatacga	3840
gtcttttaatt	aactggcaaa	ccgaggaact	cttggtattc	ttgccacgac	tcacttccgt	3900
gcagttggac	gatatcaatg	ccgtaatcat	tgaccagagc	caaaacatcc	tccttagggt	3960
gattacgaaa	cacgccaacc	aagtatttctg	gagtgcctga	actattttta	tatgctttta	4020
caagacttga	aatttttcctt	gcaataaccg	ggtaaatgtt	tctcttttcta	ttgggcacac	4080
atataatacc	cagcaagtca	gcatcggaat	ctagagcaca	ttctgcgggc	tctgtgctct	4140
tcaagccgca	aactttcacc	aatggaccag	aactacctgt	gaaattaata	acagacatac	4200
tccaagctgc	ctttgtgtgc	ttaatcacgt	atactcacgt	gctcaatagt	caccaatgcc	4260
ctccctcttg	gccctctcct	tttctttttt	cgaccgaatt	tcttgaagac	gaaagggcct	4320
cgtgatacgc	ctatttttat	aggttaatgt	catgataata	atggtttctt	aggacggatc	4380
gcttgccctgt	aacttacacg	cgcctcgat	cttttaatga	tgggaataatt	tgggaattta	4440
ctctgtgttt	atttattttt	atgttttgta	tttggtttt	agaaagtaaa	taaagaagggt	4500
agaagagtta	cggaatgaag	aaaaaaaaat	aaacaaagggt	ttaaaaaatt	tcaacaaaaa	4560
gcgtacttta	catatatatt	tattagacaa	gaaaagcaga	ttaaatagat	atacattcga	4620
ttaacgataa	gtaaaatgta	aaatcacagg	attttcgtgt	gtggtcttct	acacagacaa	4680
gatgaaacaa	ttcggcatta	atacctgaga	gcaggaagag	caagataaaa	ggtagtattt	4740
gttgccgcatc	cccctagagt	cttttacatc	ttcgaaaaac	aaaaactatt	ttttctttaa	4800
tttctttttt	tactttctat	ttttaattta	tatatattata	ttaaaaaatt	taaattataa	4860
ttattttttat	agcacgtgat	gaaaaggacc	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	4920
gaacccttat	ttgttttatt	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	4980
aacctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	5040
gtgtgcctct	tattcccttt	tttgccgcat	tttgccctcc	tggtttttgct	caccagaaa	5100
cgctggtgaa	agtaaaaagt	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaa	5160
tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	5220
tgagcacttt	taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	5280
agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	5340
cagaaaagca	tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgtc	gccataacca	5400
tgagtataaa	cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	5460
ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgctc	tgatcgttgg	gaaccggagc	5520

tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gctgtgtagca	atggcaacaa	5580
cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	5640
actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg	ctcggccctt	ccggctggct	5700
ggtttattgc	tgataaatct	ggagccgggtg	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	5760
tggggccaga	tggttaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggc	agtcaggcaa	5820
ctatggatga	acgaaataga	cagatcgctg	agatagggtc	ctcactgatt	aagcattggg	5880
aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	5940
ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaactc	ccttaacgtg	6000
agttttcggt	ccactgagcg	tcagaccccg	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	6060
ctttttttct	gcgcgtaatc	tgctgcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	6120
tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	6180
cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	6240
ctgtagcacc	gcctacatac	ctcgctctgc	taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	6300
gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttggact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	6360
ggtcgggctg	aacggggggg	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	6420
aactgagata	ccctacagcg	gagcatttag	aaagcggcac	gcttcccgaa	gggagaaaag	6480
cggacaggta	tccggtaagc	ggcagggctg	gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	6540
gggggaacgc	ctggtatctt	tatagtctcg	tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	6600
gatttttgtg	atgctcgtea	ggggggccga	gcctatggaa	aaacggccagc	aacgcggcct	6660
ttttacgggt	cctggccttt	tgctggcctt	ttgctcacat	gttctttcct	gcgttatccc	6720
ctgattctgt	ggataaccgt	attaccgcct	ttgagtgagc	tgataccgct	cgccgcagcc	6780
gaacgaccga	gcgcagcgag	tcagtgcgag	aggaagcgga	agagcgccca	atagcgaac	6840
cgctctctcc	cgcgcgttgg	ccgattcatt	aatgcagctg	gcacgacagg	tttcccagct	6900
ggaaagcggg	cagtgcgcgc	aacgcaatta	atgtgagtta	cctcactcat	taggcacccc	6960
aggctttaca	ctttatgctt	ccggctccta	tggtgtgtgg	aattgtgagc	ggataacaat	7020
ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgatt	acgccaagct	cggaaattaac	cctcactaaa	7080
gggaacaaaa	gctggctagt					7100

Figura 27 (SEC ID N° 82) : 4D5lp

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS	60
RFGSGRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	120
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSLSTLT	180
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSPVTKSFN	RGEC			214

Figura 28 (SEC ID N° 427) : plásmido pYD1dX dCH1dCH3 Fcab wt

acggattaga	agccgcgcgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgctctc	accgggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgtcag	taattgcggg	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtgggtgggtg	tggttctggt	ggtgggtggtt	840
ctgggtgggtg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccgagc	ccaagagcag	cgacaagaca	cacacgtgtc	960
ccccatgtcc	cgccccgtag	ctgctgggag	gcccctccgt	gttccctgtt	cctcccaagc	1020
caaaggacac	cctgatgata	tcccggaccc	ctgaggtgac	ctgtgtgggtg	gtggacgtga	1080
gccacgagga	cccagagggtg	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	1140
ccaagaccaa	gcctagagag	gagcagtaca	acagcaccta	ccgcgtgggtg	agcgtgctga	1200
ccgtgctgca	ccaggattgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtg	agcaacaagg	1260
ccctgcctgc	ccccatcgag	aagaccatct	ccaaggccaa	gggccagcct	cgagaaggta	1320
agcctatccc	taaccctctc	ctcggctctcg	attctacgcg	taccggtcat	catcaccate	1380

ES 2 490 192 T3

accattgagt	ttaaaccgcg	tgatctgata	acaacagtgt	agcgcccgct	cgatcgagtc	1440
tagaggggccc	ttcgaaggta	agcctatccc	taaccctctc	ctcggtctcg	attctacgcg	1500
taccgggtcat	catcaccatc	accattgagt	ttaaaccgcg	tgatctgata	acaacagtgt	1560
agatgtaaca	aaatcgactt	tggtccact	gtacttttag	ctcgtaaaa	atacaatata	1620
cttttcattt	ctccgtaaac	aacatgtttt	cccatgtaat	atccttttct	atttttcggt	1680
ccgttaccaa	ctttacacat	actttatata	gctattcact	tctatacact	aaaaaactaa	1740
gacaatttta	attttgctgc	ctgccatatt	tcaatttggt	ataaattcct	ataattttatc	1800
ctattagtag	ctaaaaaaag	atgaatgtga	atcgaatcct	aagagaattg	ggcaagtgcga	1860
caaacaatac	ttaaataaat	actactcagt	aataacctat	ttcttagcat	ttttgacgaa	1920
atttgctatt	ttggttagagt	cttttacacc	atttgtctcc	acacctccgc	ttacatcaac	1980
accaataacg	ccatttaatc	taagcgcatc	accaacattt	tctggcgta	gtccaccagc	2040
taacataaaa	tgtaagctct	cggggctctc	ttgccttcca	accagtcag	aaatcgagtt	2100
ccaatccaaa	agttcacctg	tcccacctgc	ttctgaatca	aacaaggga	taaacgaattg	2160
aggttttctgt	gaagctgcac	tgagtagtat	gttgcagtct	tttgaaaata	cgagttctttt	2220
aataactggc	aaaccgagga	actcttggtg	ttcttgccac	gactcatctc	cgtgcagttg	2280
gacgatatac	atgccgtaat	cattgaccag	agccaaaaca	tctccttag	gttgattacg	2340
aaacacgcca	accaagtatt	tcggagtgc	tgaactattt	ttatatgctt	ttacaagact	2400
tgaaattttc	cttgcaataa	ccgggtcaat	tgttctcttt	ctattgggca	cacatataat	2460
accagcaag	tcagcatcgg	aatctagagc	acattctcgc	gcctctgtgc	tctgcaagcc	2520
gcaaactttc	accaatggac	cagaactacc	tgtgaaatta	ataacagaca	tactccaagc	2580
tgcttttggt	tgcttaatac	cgtataactc	cgtgctcaat	agtcaccaat	gccctccctc	2640
ttggccctct	ccttttcttt	tttcgaccga	atttcttgaa	gacgaaagg	cctcgtgata	2700
cgctattttt	tataggttaa	tgctatgata	ataatgggtt	cttaggacgg	atcgcttgcc	2760
tgtaacttac	acgcgcctcg	tatcttttaa	tgatggaata	atttgggaat	ttactctgtg	2820
tttattttatt	tttatgtttt	gtatttggtg	tttagaaagt	aaataaagaa	ggtagaagag	2880
ttacggaatg	aagaaaaaaa	aataaataaa	ggtttaaaaa	atttcaacaa	aaagcgtact	2940
ttacatatat	atttattaga	caagaaaagc	agattaaata	gatatacatt	cgattaacga	3000
taagtaaaat	gtaaaatcac	aggattttcg	tgtgtggtct	tctacacaga	caagatgaaa	3060
caattcggca	ttaatacctg	agagcaggaa	gagcaagata	aaaggtagta	tttgttgccg	3120
atccccctag	agtcttttac	atcttcggaa	aacaaaaact	attttttctt	taatttcttt	3180
ttttactttt	tatttttaat	ttatatattt	atattaaaaa	attttaaatta	taattatttt	3240
tatagcacgt	gatgaaaagg	accaggtgg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	3300
tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	3360
ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	3420
ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tctgtttttt	gctcaccag	aaacgctggt	3480
gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgacagagt	ggttacatcg	aactggatct	3540
caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	3600
ttttaaaagt	ctgctatgtg	gcgcgggtatt	atcccggtgt	gacgcggggc	aagagcaact	3660
cggtcgcccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	3720
gcactctaac	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	3780
taacactgcg	gccaaacttac	tctgacaaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	3840
tttgcaacaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	3900
agccataacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	3960
caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	4020
ggaggcggtat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttcgggtcg	gctggtttat	4080
tgctgataaaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	atcattgcag	cactggggcc	4140
agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagtatt	ctacacgacg	ggcagtcagg	caactatgga	4200
tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctactg	attaagcatt	ggtaactgtc	4260
agaccaagtt	tactcatata	tactttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aattttaaag	4320
gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	gtgagttttc	4380
gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaaagg	tcttcttgag	atcctttttt	4440
tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccacgg	ctaccagcgg	tggtttgttt	4500
gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggttaact	ggcttcagca	gagcgcagat	4560
accaaataact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	4620
accgcctaca	tacctcgctc	tgctaactct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	4680
gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcgtcggg	4740
ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgca	acgacctaca	ccgaactgag	4800
atacctacag	cgtgagcatt	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaa	aggcgagacg	4860
gtatccgggtc	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	caggggggaa	4920
cgcttggtat	cttttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	4980
gtgatgctcg	tcaggggggc	cgagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	5040

gttccctggcc	ttttgtctgc	cttttgcctc	catgtttctt	cctgcgttat	cccctgattc	5100
tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	5160
cgagcgcagc	gagtcagtg	gcgaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	aaccgcctct	5220
ccccgcgcgt	tggccgattc	attaatgcag	ctggcacgac	agggtttccc	actggaaagc	5280
gggcagtgag	cgcaacgcaa	ttaatgtgag	ttacctcact	cattagggac	cccaggtctt	5340
acactttatg	cttccggctc	ctatgtttgt	tggaattgtg	agcggataac	aattttcacac	5400
aggaaacagc	tatgaccatg	attacgccaa	gctcggaatt	aaccctcact	aaagggaaca	5460
aaagctggct	agt					5473

Figura 29 (SEC ID N° 428) : PYD1dX dCH1 Fcab wt

acggattaga	agccgcgcag	cggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgccgcgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtTTTTT	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accacttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgcag	taattgcggt	tctcacccct	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccgagc	ccaagagcag	cgacaagaca	cacacgtgtc	960
ccccatgtcc	cgccccctgag	ctgctggggc	gcccttccgt	gttccctgtt	cctcccaagc	1020
caaaggacac	cctgatgac	tcccggaacc	ctgaggtgac	ctgtgtggtg	gtggacgtga	1080
gccacgagga	ccagagggtg	aagtccaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	1140
ccaagacca	gcctagagag	gagcagtaca	acagcaccta	ccgcgtggtg	agcgtgctga	1200
ccgtgctgca	ccaggattgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggt	agcaacaagg	1260
ccctgcctgc	ccccatcgag	aagaccatct	ccaaggccaa	gggccagcct	cgagaaccac	1320
agggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	agcctgacct	1380
gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tgcgcgtgga	gtgggagagc	aatggggcagc	1440
cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgtctgactc	cgacggctcc	ttcttctctt	1500
acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcatgctccg	1560
tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cacagaagag	cctctccctg	tctccgggta	1620
aatgagcggc	cgctcgatcg	agtctagagg	gcccttcgaa	ggtaagccta	tccctaacc	1680
tctcctcggt	ctcgattcta	cgctgaccgg	tcatcatcac	catcaccatt	gagtttaaac	1740
ccgctgatct	gataacaaca	gtgtagatgt	aacaaaaatc	actttgttcc	cactgtactt	1800
ttagctcgta	taataataca	tatacttttc	atttctcgt	aaacaacatg	ttttcccatg	1860
taataatcct	ttctattttt	cgttccgtta	ccaactttac	acatacttta	tatagctatt	1920
cacttctata	cactaaaaaa	ctaagacaat	tttaattttg	ctgcctgcc	tatttcaatt	1980
tggtataaat	tcctataatt	tatcctatta	gtagctaaaa	aaagatgaat	gtgaatcgaa	2040
tcctaagaga	attgggcaag	tgacaaaaca	atacttaaat	aaatactact	cagtaataac	2100
ctattttctta	gcatttttga	cgaaatttgc	tattttgtta	gagtctttta	caccatttgt	2160
ctccacacct	cgcttacat	caacaccaat	aacgccattt	aatctaagcg	catcaccaac	2220
attttctggc	gtcagtcac	cagctaacat	aaaatgtaag	ctctcggggc	tctcttgctt	2280
tccaacccag	tcagaaatcg	agttccaatc	caaaagttca	cctgtccac	ctgcttctga	2340
atcaacaag	ggaataaacg	aatgaggttt	ctgtgaagct	gcactgagta	gtatgttgca	2400
gtcttttgg	aatacagagc	ttttaataac	tggcaaacgg	aggaaactct	ggtattcttg	2460
ccacgactca	tctccgtgca	gttggaacgat	atcaatgccg	taatcattga	ccagagccaa	2520
aacatcctcc	ttaggttgat	tacgaaacac	gccaaaccaag	tatttcggag	tgccctgaact	2580
atttttatat	gtttttacaa	gacttgaaat	tttccctgca	ataaccgggt	caattgttct	2640
ctttctattg	ggcacacata	taatacccag	caagtcagca	tccgaatcta	gagcacattc	2700
tgccgcctct	gtgctctgca	agccgcaaac	tttccaccaat	ggaccagaac	tacctgtgaa	2760
attaataaca	gacatactcc	aagctgcctt	tgtgtgctta	atcacgtata	ctcacgtgct	2820
caatagtcac	caatgccctc	cctcttgccc	ctctcctttt	cttttttctga	ccgaatttct	2880
tgaagacgaa	aggccctcgt	gatacgccta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	2940
gtttcttagg	acggatcgct	tgctgtaac	ttacacgcgc	ctcgtatctt	ttaatgatgg	3000

aataatttgg	gaatttactc	tgtgtttatt	tattttttatg	ttttgtattt	ggatttttaga	3060
aagtaaataa	agaaggtaga	agagttacgg	aatgaagaaa	aaaaaataaa	caaaggttta	3120
aaaaatttca	acaaaaagcg	tactttacat	atatatttat	tagacaagaa	aagcagatta	3180
aatagatata	cattcgatta	acgataagta	aaatgtaaaa	tcacaggatt	ttcgtgtgtg	3240
gtcttctaca	cagacaagat	gaaacaattc	ggcattaata	cctgagagca	ggaagagcaa	3300
gataaaaagg	agtatttggt	ggcgatcccc	ctagagtcct	ttacatcttc	ggaaaacaaa	3360
aactattttt	tctttaattt	ctttttttac	tttctatttt	taattttatat	atztatatta	3420
aaaaatttaa	attataatta	tttttatagc	acgtgatgaa	aaggacccag	gtggcacttt	3480
tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	3540
tcgcgtcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	3600
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccttttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	3660
ttttgctcac	ccagaaaacg	tgggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	3720
agtggtgttac	atcgaaactg	atctcaacag	cggtaaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	3780
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	3840
tgttgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	3900
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	3960
cagtgtctgcc	ataacctga	gtgataaacac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	4020
aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga	4080
tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	4140
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaac	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	4200
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	4260
ggcccttcctg	gctggctggt	ttattgtctga	taaactctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	4320
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	4380
gacgggcagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	4440
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	4500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	4560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	4620
aggatcttct	tgagatcctt	ttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	4680
accgctacca	gcggtggttt	gtttgcggga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaagg	4740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	4800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	4860
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttacccgg	ttggactcaa	gacgatagtt	4920
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	4980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	cattgagaaa	gcgccacgct	5040
tcccgagggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggctcgga	caggagagcg	5100
cacgagggag	cttcagggg	ggaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	5160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggccgagcc	tatggaaaaa	5220
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcc	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatgtt	5280
ctttcctgctg	ttatccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgaagctga	5340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcaggtca	gtgagcgagg	aagcgggaaga	5400
gcgccccata	cgcaaacgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	5460
cgacaggttt	cccagctgga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttacct	5520
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcctatgt	tgtgtggaat	5580
tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagctcgg	5640
aattaaccct	cactaaagg	aacaaaagct	ggctagt			5677