

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 856**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2006** **E 06850958 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 1973948**

54 Título: **Métodos y composiciones para dirigirse a la poliubiquitina**

30 Prioridad:

15.12.2005 US 751081 P
21.04.2006 US 793980 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
18.05.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

GORDON, NATHANIEL C.;
KELLEY, ROBERT F.;
PHAM, ANH y
HYMOWITZ, SARAH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 856 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

Métodos y composiciones para dirigirse a la poliubiquitina

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos anti-poliubiquitina, y más particularmente a anticuerpos anti-poliubiquitina que no se unen específicamente con monoubiquitina y que pueden diferenciar entre poliubiquitinas que tienen diferentes enlaces isopeptídicos.

10 Antecedentes

La ubiquitina es una proteína pequeña que tiene importantes papeles reguladores en una amplia diversidad de rutas celulares. El mejor conocido de estos es el papel de la ubiquitina en la degradación de proteínas, en la que la unión covalente de ubiquitina con una proteína diana permite que la proteína diana se reconozca y se destruya por el proteasoma 26S (véase, Wilkinson, *Semin. Cell Devel. Biol.* 11(3): 141-148 (2000)). La regulación de proteína quinasa de diversas de rutas de señalización también se ha correlacionado con ubiquitinación (véase Sun y Chen, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119-126 (2004)). Por ejemplo, la fosforilación de MB por I κ B quinasa permite la ubiquitinación de I κ B y posterior degradación por el proteasoma 26S; debido a que I κ B es un inhibidor de NF κ B, la degradación de I κ B activa NF κ B (Ghosh y Karin, (*Supl.*): S81-S96 (2002); Palombella *et al.*, *Cell* 78: 773-785 (1994)). La ubiquitinación también media en la reparación de ADN (véase Sun y Chen, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 119-126 (2004)). Después de dañarse el ADN, la monoubiquitinación de antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) activa polimerasas tolerantes a daño que son capaces de sintetizar ADN a pesar de cualquier lesión de ADN (Stelter y Ulrich, *Nature* 425: 188-191 (2003)). Otros procesos fisiológicos en los que se sabe que la ubiquitinación está implicada incluyen división celular, crecimiento celular, movimiento celular y apoptosis/muerte celular (Johnson, *Nat. Cell Biol.* 4:E295-E298 (2002); Pickart, *Mol. Cell.* 8: 499-504 (2001)).

La unión covalente de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos, con una proteína diana es un proceso enzimático de tres etapas (Pickart, *Annu. Rev. Biochem.* 70: 503-533 (2001)). En primer lugar, la enzima E1 activadora de ubiquitina forma un tioéster de E1-ubiquitina en una reacción dependiente de ATP. La ubiquitina se transfiere del tioéster de E1-ubiquitina a un miembro de la familia de enzima de conjugación de ubiquitina (E2) en la segunda etapa. En la tercera etapa, con la ayuda de una ubiquitina-proteína ligasa (E3), se forma un enlace isopeptídico entre el extremo carboxilo terminal de ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un resto de lisina en la proteína diana. Las enzimas denominadas desubiquitinasas retiran los restos de ubiquitina de proteínas diana (Guterman y Glickman, *Curr. Prot. Pep. Sci.* 5: 201-210 (2004)). Destacando el papel de la ubiquitina como una molécula reguladora importante, el genoma humano contiene muchas proteínas diferentes implicadas en la ubiquitinación o desubiquitinación: al menos 40 E2 diferentes, 500 E3 diferentes y 80 desubiquitinasas diferentes se han identificado hasta la fecha (Wong *et al.*, *Drug. Discov. Today* 8: 746-754 (2003)).

La ubiquitina contiene siete restos de lisina (Lys6, Lys22, Lys27, Lys33, Lys29, Lys48 y Lys63), y por lo tanto la ubiquitina en sí misma puede actuar como una proteína diana para ubiquitinación (Peng *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21: 921-926 (2003); Pickart y Fushman, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 610-616 (2004)). La molécula producida tras ubiquitinación de una proteína ubiquitina se denomina una molécula de poliubiquitina, y puede comprender dos o más restos de ubiquitina. La ubiquitinación de la ubiquitina puede producirse teóricamente en cualquiera de los siete restos de lisina (Peng *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 21: 921-926 (2003)), de modo que existen diferentes especies de poliubiquitinas que tienen enlaces isopeptídicos con diferentes restos de lisina dentro de la ubiquitina. Es posible que una única molécula de poliubiquitina con más de dos restos de ubiquitina pueda tener más de un tipo de enlace de lisina. Los estudios han mostrado que la enzima E2 influye en el tipo de enlace de lisina creado entre una molécula de ubiquitina y otra. (Tenno *et al.*, *Genes to Cells* 9: 865-875 (2004); Deng *et al.* (2000); Hofmann y Pickart (2001)). La poliubiquitina y ubiquitina existen tanto como moléculas libres como en unión covalente con una proteína diana.

Como la ubiquitina, se ha descubierto la implicación de la poliubiquitina en muchos procesos celulares, incluyendo tráfico intracelular, endocitosis, expresión/silenciamiento génico, proteólisis, activación de quinasa, traducción y reparación de ADN (Hoege *et al.*, *Nature* 419:135-141 (2002); Spence *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 15: 1265-1273 (1995); Hofmann y Pickart, *Cell* 96: 645-653 (1999)). Sin embargo, la poliubiquitina y poliubiquitinación pueden tener papeles fisiológicos sorprendentemente diferentes de la monoubiquitina y monoubiquitinación en las mismas rutas. Por ejemplo, mientras que la monoubiquitinación de PCNA después de daño a ADN da como resultado la activación de ADN polimerasas propensas a errores, la poliubiquitinación de PCNA en el resto idéntico en el que se observa monoubiquitinación da como resultado activación de reparación de ADN sin errores (Stelter y Ulrich, *Nature* 425: 188-191 (2003); Hoege *et al.*, *Nature* 419:135-141 (2002); Spence *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 15: 265-1273 (1995); y Hofmann y Pickart, *Cell* 96: 645-653 (1999)).

Incluso las poliubiquitinas que tienen diferentes enlaces de lisina parecen desempeñar diferentes papeles fisiológicos. Los dos mejores estudiados son las poliubiquitinas con enlaces Lys48 y con enlaces Lys63, y estudios estructurales de las dos sugieren que diferentes poliubiquitinas con enlaces de lisina pueden adoptar conformaciones notablemente diferentes, lo que permite diferentes interacciones con compañeros de unión

seleccionados (Tenno *et al.*, Genes to Cells 9: 865-875 (2004)). La modificación covalente por poliubiquitina con enlaces Lys48 normalmente marca la proteína diana para degradación proteolítica, aunque hay algunas pruebas de que la poliubiquitina con enlaces de Lys48 también puede regular ciertas proteínas por medios no proteolíticos (Chau *et al.*, Science 243: 1576-1583 (1989); Finley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick *et al.*, Nat. Cell. Biol. 6: 634-641 (2004)). Las poliubiquitinas con enlaces Lys63, por el contrario, se han ligado a diversas rutas intracelulares no proteolíticas, incluyendo reparación de ADN (las células de levadura que expresan ubiquitina-K63R son defectuosas en reparación de ADN), activación de quinasas, tráfico intracelular y traducción (Pickart y Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004); Hicke y Dunn, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 141-172 (2003); Spece *et al.*, Mol. Cell Biol. 15: 1265-1273 (1995); Ulrich, Eukaryot. Cell 1: 1-10 (2002); Spence *et al.*, Cell 102: 67-76 (2000); Seibenhener *et al.*, Mol. Cell. Biol. 24(18): 8055-8068 (2004)). En un ejemplo específico, la sinfilina-1 se ubiquitina normalmente con poliubiquitina con enlaces de K63 por parkina de una manera independiente de proteasoma, pero la sinfilina-1 puede marcarse como alternativa para destrucción por ubiquitinación con poliubiquitina con enlaces K48 (Lim *et al.*, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)). Un análisis de sujetos con enfermedad de Parkinson muestra que la poliubiquitinación K63 de sinfilina-1 puede estar implicada en la formación de inclusiones de cuerpos de Lewy asociados con esa enfermedad (Lim *et al.*, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)).

Otras poliubiquitinas con enlaces de lisina no se han estudiado exhaustivamente, en gran medida debido a la dificultad para distinguirlas. Los estudios hasta la fecha se han basado en células que expresan ubiquitinas mutadas en las que una o más lisinas se han retirado, en poliubiquitinas sintetizadas de forma enzimática de enlaces particulares, o en técnicas tales como espectrometría de masas para distinguir entre un tipo de poliubiquitina y otro. Cada una de estas metodologías está mal adaptada o es incómoda para el análisis del comportamiento fisiológico normal de poliubiquitinas con enlaces de lisina particulares. Aunque existen anticuerpos que son específicos para poliubiquitina a diferencia de monoubiquitina (Fujimoro *et al.*, FEBS Lett. 349: 173-180 (1994)), aún no hay anticuerpos que puedan distinguir entre poliubiquitinas de diferentes enlaces de lisina.

No resulta sorprendente que dado sus papeles importantes en diversos procesos celulares, la ubiquitina y las poliubiquitinas también se han implicado en muchas enfermedades, véase (Argiles, Ubiquitin and Disease, R. G. Landes (1998)). Se observa desregulación de ubiquitina en debilitamiento muscular (Mitch y Goldberg, New Engl. J. Med. 335: 1897-905 (1996); Bodine *et al.*, Science 294: 1704-1708 (2001)). Se han ligado varias enfermedades genéticas a la actividad de ubiquitina aberrante, incluyendo fibrosis quística (Ward *et al.*, Cell 83: 121-127 (1995)), síndrome de Angelman (Kishino *et al.*, Nature Genet. 15: 70-73 (1997)), y síndrome de Liddle (Staub *et al.*, EMBO J 16: 6325-6336 (1997)). La ubiquitina también desempeña un papel en las respuestas inmunitarias e inflamatorias; por ejemplo, se ha descubierto que la ubiquitina extracelular actúa como un tipo de citocina, inhibiendo la respuesta de TNF α a endotoxina en células mononucleares de sangre periférica y regulando la hipersensibilidad a endotoxina (Majetschak *et al.*, Blood 101: 1882-1890 (2003); Ciechanover, EMBO J 17: 7151-7160 (1998)). Además, se ha descubierto tanto ubiquitina como poliubiquitina en suero humano, con mayores niveles de ambas moléculas observados en el suero de pacientes que tienen enfermedad parasitaria y alérgica (Takada *et al.*, Clinical Chem. 43: 1188-1195 (1997)).

La desregulación de varias rutas mediadas por ubiquitina también se ha implicado en el cáncer (Spataro *et al.*, Br. J. Cancer 77: 448-55 (1998); Beckmann *et al.*, Hum. Mutat. 25: 507-12 (2005)). Por ejemplo, las mutaciones en la ubiquitina ligasa heterodimérica BRCA1-BARD1 se correlacionan con cáncer de mama (Hashizume *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 14537-40 (2001)), las mutaciones que alteran la capacidad de Myc para degradarse por la ruta de ubiquitina activan el potencial oncogénico de c-Myc (Salghetti *et al.*, EMBO J. 18: 717-726 (1999)), y v-Jun transformado no puede ubiquitinizarse y degradarse como su equivalente no oncogénico, c-Jun, dando lugar a crecimiento descontrolado (Ciechanover, EMBO J. 17: 7151-7160 (1998); Trier *et al.*, Cell 78: 787-798 (1994)).

La ubiquitina y la poliubiquitina se han estudiado particularmente en el contexto de enfermedades neurológicas (Chung *et al.*, TINS 24(11 Supl.) S7-S14 (2001)). Las inclusiones, cuerpos y ovillos neurofibrilares que se acumulan en enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar, encefalopatías priónicas, enfermedad de Pick, enfermedad de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer se tiñen inmunopositivamente para mono y/o poliubiquitina (Alves-Rodrigues *et al.*, Trends Neurosci. 21: 516-520 (1998); Cammarata *et al.*, Neurosci Lett. 156: 96-98 (1993); Kalchman *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 19385-94 (1996); Holmberg *et al.*, Human Mol. Genet. 7: 913-918 (1998); Yedidia *et al.*, EMBO J. 20: 5383-91 (2001); Mori *et al.*, Science 235: 1641-44 (1987); Leigh *et al.*, Acta Neuropathol. (Berl.) 79: 61-72 (1989); y Kuzuhara *et al.*, Acta Neuropathologica 75: 345-353 (1988)). Varias formas de enfermedad de Parkinson se han ligado a mutaciones en el gen de la ubiquitina hidrolasa L1 carboxilo terminal (UCH-L1), una desubiquitinasa (Leroy *et al.*, Nature 395: 451-452 (1998)), mientras que otras formas de Parkinson se han ligado a mutaciones inactivadoras en Parkina, una ubiquitina proteína ligasa dependiente de E2 que se sabe que interacciona con la enzima de conjugación con ubiquitina UbcH7 y con ubiquitinato sinfilina-1 (Shimura *et al.*, Nature Genet. 25: 302-305 (2000); Zhang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 13354-13359 (2000); Lim *et al.*, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)). Ambos tipos de mutaciones dan como resultado procesamiento proteolítico aberrante y la agregación inapropiada de proteínas (véase McNaught *et al.*, Nature Rev. Neurosci. 2: 589-594 (2001)). También se ha descubierto que mutaciones de UCH-L1 se segregan con la enfermedad de Huntington (Naze *et al.*, Neurosci. Lett. 328: 1:1-4 (2002)). Se ha identificado una forma mutante de ubiquitina en los cerebros de pacientes con Alzheimer que se incorpora muy eficazmente en cadenas de poliubiquitina, pero es refractaria a desubiquitinación una vez formada, lo que conduce potencialmente a inhibición dominante del sistema de

procesamiento proteolítico celular normal (Lam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 9902-9906 (2000)).

Resulta evidente que sería beneficioso no solamente tener composiciones y métodos que puedan distinguir entre poliubiquitinas de diferentes enlaces de lisina, sino también tener composiciones y métodos que sean eficaces en la dirección y modulación de las rutas mediadas por ubiquitina y poliubiquitina. La invención proporcionada en el presente documento se refiere a dichas composiciones y métodos.

Divulgación de la invención

La invención proporciona nuevos anticuerpos capaces de unirse con y/o regular las actividades biológicas asociadas con poliubiquitina como se define en las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con una primera poliubiquitina con enlaces K48, en el que el anticuerpo no se une específicamente con una segunda poliubiquitina que comprende una forma con enlaces de lisina diferentes de poliubiquitina (es decir, poliubiquitina sin enlaces K48) en el que la segunda poliubiquitina es poliubiquitina con enlaces K63 como se define en las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con una primera poliubiquitina con enlaces K63, en el que el anticuerpo no se une específicamente con una segunda poliubiquitina que comprende una forma con enlaces de lisina diferentes de poliubiquitina (es decir, poliubiquitina sin enlaces K63) en el que la segunda poliubiquitina es poliubiquitina con enlaces K48 como se define en las reivindicaciones.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente tanto con una primera poliubiquitina que comprende un primer enlace de lisina como con una segunda poliubiquitina que comprende un segundo enlace de lisina, en el que el primer enlace de lisina difiere del segundo enlace de lisina, en el que el anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo se une con la segunda poliubiquitina con una afinidad de unión sustancialmente reducida en comparación con la afinidad de unión del anticuerpo por la primera poliubiquitina como se define en las reivindicaciones.

En una realización la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con:

(i) poliubiquitina con enlaces de lisina 48, que comprende:

- (a) secuencias de HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu01, apu02, apu03, apu04, apu05, apu06, apu07, apu08, apu09, apu10, apu11, apu12, apu13, apu14 o apu15 mostradas como SEC ID N°: 265-279; SEC ID N°: 281-295; y SEC ID N°: 297-311, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu01, apu02, apu03, apu04, apu05, apu06, apu07, apu08, apu09, apu10, apu11, apu12, apu13, apu14 o apu15 mostrada como SEC ID N°: 313-327; o
- (b) secuencias de HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu2.01, apu2.02, apu2.03, apu2.04, apu2.05, apu2.06, apu2.07, apu2.08, apu2.09 o apu2.10 mostradas como SEC ID N°: 695-704; SEC ID N°: 706-715; y SEC ID N°: 717-726, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu2.01, apu2.02, apu2.03, apu2.04, apu2.05, apu2.06, apu2.07, apu2.08, apu2.09 o apu2.10 mostradas como SEC ID N°: 728-737.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 48, en el que el anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1, de SEC ID N°: 269, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 285, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 301, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 317. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 48, en el que el anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 701, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 712, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 723, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 734. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 48, en el que el anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 701, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 712, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 723, y una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, y secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 734.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con:

(i) poliubiquitina con enlaces de lisina 63, que comprende:

(a) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestra para un clon seleccionado de apu17, apu18, apu19, apu20, apu21, apu22, apu23 y apu24 mostradas como SEC ID N°: 329-336, 338-345 y 347-354, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu17, apu18, apu19, apu20, apu21, apu22, apu23 y apu24 mostradas como SEC ID N°: 356-363; o

(b) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestra para un clon seleccionado de apu2.11, apu2.12, apu2.13, apu2.14, apu2.15, apu2.16, apu2.17, apu2.18, apu2.19 y apu2.20 mostradas como SEC ID N°: 739-748, 750-759 y 761-770, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1, mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu2.11, apu2.12, apu2.13, apu2.14, apu2.15, apu2.16, apu2.17, apu2.18, apu2.19 y apu2.20 mostradas como SEC ID N°: 772-781; o

(c) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestra para un clon seleccionado de apu3.01, apu3.02, apu3.03, apu3.04, apu3.05, apu3.06, apu3.07, apu3.08, apu3.09, apu3.10 y 3.1 mostradas como SEC ID N°: 789-799, 801-811 y 813-823, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 777.

En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 330, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 339, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 348, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 357. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 739, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 750, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 761, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 772. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que el anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 740, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 751, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 762, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 773. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 744, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 755, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 766, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 777. En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que anticuerpo no se une específicamente con monoubiquitina, y en el que anticuerpo comprende una secuencia de HVR-H1 de SEC ID N°: 795, una secuencia de HVR-H2 de SEC ID N°: 807, una secuencia de HVR-H3 de SEC ID N°: 819, una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 de SEC ID N°: 777.

En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados se une específicamente con una proteína poliubiquitinada. En un aspecto, el anticuerpo inhibe además la degradación de la proteína poliubiquitinada. En un aspecto, el anticuerpo modula además al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina. En un aspecto, el anticuerpo inhibe además al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina. En un aspecto, el anticuerpo estimula además al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina.

En un aspecto, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención. En un aspecto, se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico. En un aspecto, se proporciona una célula hospedadora que comprende el vector. En un aspecto, se proporciona una línea celular capaz de producir un anticuerpo de la invención. En un aspecto, se proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones en las que se produce el anticuerpo. En un aspecto, se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona un método para identificar la presencia de poliubiquitina o una proteína poliubiquitinada en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo de la invención. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo de la invención para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la desregulación de la poliubiquitina en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo de la invención. En un aspecto, el paciente es un paciente mamífero. En un aspecto, el paciente es ser humano. En un aspecto, la enfermedad se selecciona de cáncer, un trastorno muscular, un trastorno genético relacionado con la ruta de ubiquitina, un trastorno inmunitario/inflamatorio, y un trastorno neurológico. En un aspecto, la enfermedad se

selecciona de carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick y enfermedad de Paget.

5 En un aspecto, se proporciona un método para determinar la presencia de una poliubiquitina o proteína poliubiquitinada en una muestra que se sospecha que contiene una poliubiquitina o proteína poliubiquitinada que comprende exponer la muestra a al menos un anticuerpo de la invención y determinar la unión del al menos un anticuerpo con una poliubiquitina o proteína poliubiquitinada en la muestra.

10 En un aspecto, se proporciona un método para separar la proteína poliubiquitinada de proteína no poliubiquitinada en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo de la invención.

En un aspecto, se proporciona un método para determinar la función y/o actividad de poliubiquitina en una célula, que comprende poner en contacto la célula con al menos un anticuerpo de la invención y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto en la célula.

15 En un aspecto, se proporciona un método para determinar la función y/o actividad de poliubiquitina en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo de la invención y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto en la muestra.

20 En otra realización, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente con una poliubiquitina con enlaces de lisina 63, en el que el anticuerpo se une con un epítipo en la poliubiquitina con enlaces de lisina 63. En un aspecto, el epítipo incluye restos tanto en una primera subunidad de ubiquitina como en una segunda subunidad de ubiquitina de la poliubiquitina de enlace de lisina 63. En otro aspecto tal, el epítipo incluye al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionada de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-25 58, Asn-60, Ile-61 y Gln-62. En otro aspecto tal, el epítipo incluye al menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionada de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, He-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74 y Gly-75. En otro aspecto tal, el epítipo incluye al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionada de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-58, Asn-60, Ile-61 y Gln-62, y al 30 menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionada de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, Ile-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74 y Gly-75.

Un anticuerpo de la invención puede estar en cualquier variedad de formas. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En una 35 realización, un anticuerpo de la invención no es un anticuerpo humano, por ejemplo no es un anticuerpo producido en un xenomouse (por ejemplo, como se describe en el documento WO96/33735). Un anticuerpo de la invención puede ser de longitud completa o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento que comprende un componente de unión a antígeno). En otra realización, la invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos.

40 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la estructura primaria de la ubiquitina y vistas esquemáticas de ciertos enlaces isopeptídicos de poliubiquitina.

45 La Figura 1a muestra la secuencia de aminoácidos de ubiquitina humana (SEC ID N°: 377), con los restos de lisina indicados en texto en negrita, subrayado. La Figura 1b muestra una representación esquemática del enlace formado entre la lisina 48 o la lisina 63 de una primera molécula de ubiquitina y el resto de glicina C terminal de una segunda molécula de ubiquitina.

50 Las Figuras 2AC-2C muestran secuencias de bucle de HVR de cadena pesada de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K48, como se describe en el Ejemplo 1(A). El indicador "48" indica que la molécula de anticuerpo reconoció específicamente poliubiquitina con enlaces K48. El indicador "ambos" indica que la molécula de anticuerpo reconoció poliubiquitina tanto con enlaces K48 como con enlaces K63. El indicador "todo" indica que la molécula de anticuerpo reconoció la poliubiquitina tanto con enlaces K48 como enlaces K63 así como monoubiquitina. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no 55 tenían un aminoácido en la posición indicada. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

60 Las Figuras 3A-3B muestran secuencias de bucle de HVR de cadena pesada de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K63 como se describe en el Ejemplo 1(A). El indicador "63" indica que la molécula de anticuerpo reconoció específicamente poliubiquitina con enlaces K63. El indicador "ambos" indica que la molécula de anticuerpo reconoció poliubiquitina tanto con enlaces K63 como con enlaces K48. El indicador "todo" indica que la molécula de anticuerpo reconoció poliubiquitina tanto con enlaces K63 como con enlaces K48 así como monoubiquitina. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no 65 tenían un aminoácido en la posición indicada. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

Las Figuras 4A y 4B y la Figura 5 representan secuencias marco conservadas consenso humanas aceptoras ejemplares para su uso en la práctica de la presente invención con los siguientes identificadores de secuencia:

Marcos conservados consenso pesados variables (VH) (Figuras 4A y 4B)

Marco conservado consenso VH humano subgrupo I menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 111, 839, 858 y 877)
 Marco conservado consenso VH humano subgrupo I menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 112-114, 840-842, 859-861 y 878-880)
 Marco conservado consenso VH humano subgrupo II menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 115, 843, 862 y 881)
 Marco conservado consenso VH humano subgrupo II menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 116-118, 844-846, 863-865 y 882-884)
 Marco conservado consenso VH humano subgrupo III menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 119, 847, 866 y 885)
 Marco conservado consenso VH humano subgrupo III menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 120-122, 848-850, 867-869 y 886-888)
 Marco conservado aceptor VH humano menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 123, 851, 870 y 889)
 Marco conservado aceptor VH humano menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 124-125, 852-853, 871-872 y 890-891)
 Marco conservado VH humano aceptor 2 menos CDR de Kabat (SEC ID N°: 126, 854, 873 y 892)
 Marco conservado VH humano aceptor 2 menos regiones hipervariables extendidas (SEC ID N°: 127-129, 855-857, 874-876 y 893-895)

Marcos conservados consenso ligeros variables (VL) (Figura 5)

Marco conservado consenso VL kappa humano subgrupo I (SEC ID N°: 130, 896, 900 y 904)
 Marco conservado consenso VL kappa humano subgrupo II (SEC ID N°: 131, 897, 901 y 905)
 Marco conservado consenso VL kappa humano subgrupo III (SEC ID N°: 132, 898, 902 y 906)
 Marco conservado consenso VL kappa humano subgrupo IV (SEC ID N°: 133, 899, 903 y 907)

La Figura 6 representa secuencias de región marco conservada de cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

La Figura 7 representa secuencias de región marco conservada modificadas/variantes de cadenas ligera y pesada de huMAb4D5-8. Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos de acuerdo con Kabat.

Las Figuras 8A-8C muestran secuencias de bucle de HVR de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K48, como se describe en el Ejemplo 1A. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

Las Figuras 9A-9B muestran secuencias de bucle de HVR de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K63, como se describe en el Ejemplo 1A. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

Las Figuras 10A-10C muestran secuencias de bucle de HVR de cadena ligera y cadena pesada de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina apu01-apu15 que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K48 y que se reconocían por un anticuerpo específico para pentahistidina, como se describe en el Ejemplo 1(B). La figura muestra las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3 y la secuencia de HVR de cadena ligera, L3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

Las Figuras 11A-11C muestran secuencias de bucle de HVR de cadena pesada y cadena ligera de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina apu17-apu24 que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K63 y que se reconocían por un anticuerpo específico para pentahistidina, como se describe en el Ejemplo 1(B). Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3 y la secuencia de HVR de cadena ligera, L3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente.

La Figura 12 representa las interacciones de unión entre diversas concentraciones del Fab anti-poliubiquitina apu09 y poliubiquitina con enlaces K48 o enlaces K63 observadas usando análisis de BIACORE®, como se describe en el Ejemplo 1(C).

Las Figuras 13A-13B representan las interacciones de unión entre diversas concentraciones del Fab anti-poliubiquitina apu18 y poliubiquitina con enlaces K48 o enlaces K63 observadas usando análisis de BIACORE®, como se describe en el Ejemplo 1(C).

Las Figuras 14A-14F muestran secuencias de bucle de HVR de cadena pesada de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina de segunda generación basándose en la secuencia de Fab apu05, que reconocen específicamente

poliubiquitina con enlaces K48, como se describe en el Ejemplo 2. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. El texto sombreado indica que la secuencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de HVR correspondiente en el Fab apu05. El texto en negrita indica que el anticuerpo demostraba unión fuerte en el ensayo de ELISA de fagos descritos en el Ejemplo 2.

Las Figuras 15A-15C muestran secuencias de bucle de HVR de cadena pesada de moléculas de anticuerpo anti-poliubiquitina de segunda generación basándose en la secuencia de Fab apu18, que reconocen específicamente poliubiquitina con enlaces K63, como se describe en el Ejemplo 2. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. El texto sombreado indica que la secuencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de HVR correspondiente en el Fab apu18. El texto en negrita indica que el anticuerpo demostraba unión fuerte en el ensayo de ELISA de fagos descrito en el Ejemplo 2.

Las Figuras 16A y 16B muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de cadena pesada de moléculas Fab derivadas de apu05 mutado que reconocían específicamente poliubiquitina con enlaces K48 (apu2.01-apu2.10) y que se reconocían por un anticuerpo específico para pentahistidina, como se describe en el Ejemplo 2. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3 y la secuencia de HVR de cadena ligera, L3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. El texto sombreado indica que la secuencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de HVR correspondiente en el Fab apu05.

Las Figuras 17A y 17B muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de cadena pesada de moléculas Fab derivadas de apu18 mutado que reconocían específicamente poliubiquitina con enlaces K63 (apu2.11-apu2.20) y que se reconocían por un anticuerpo específico para pentahistidina, como se describe en el Ejemplo 2. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3 y la secuencia de HVR de cadena ligera, L3. El indicador "n.p." indica que ciertos clones no tenían un aminoácido en la posición indicada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. El texto sombreado indica que la secuencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de HVR correspondiente en el Fab apu18.

La Figura 18 representa los resultados del ensayo de ELISA de fagos descritos en el Ejemplo 2 en el que se evaluó la unión de cada Fab apu-2.01-2.20 de segunda generación con poliubiquitina con enlaces K48, poliubiquitina con enlaces K63, monoubiquitina y albúmina de suero bovino.

Las Figuras 19A y 19B representan los resultados de experimentos de transferencia de western descritos en el Ejemplo 1. La Figura 19A muestra la unión de los Fab producidos a partir de los clones apu01 a apu15 con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada. La Figura 19A muestra una ausencia de unión de los Fab producidos a partir de los clones apu18 a apu24 con poliubiquitina con enlaces K63 inmovilizada.

Las Figuras 20A y 20B representan los resultados de experimentos de transferencia de western descritos en el Ejemplo 2. La Figura 20A muestra la unión de apu2.01-apu2.10 con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada y la ausencia de unión con diubiquitina con enlaces K63 inmovilizada. La Figura 20B muestra la unión de apu2.11-apu2.20 con tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y la ausencia de unión con diubiquitina con enlaces K48 inmovilizada.

Las Figuras 21A y 21B muestran transferencias de Western de experimentos de inmunoprecipitación para detectar el estado de ubiquitinación de RIP, como se describe en el Ejemplo 3. La transferencia en la Figura 21A incluye muestras que se inmunoprecipitaron con IgG apu2.16 para capturar proteínas poliubiquitinadas con enlaces K63. La transferencia en la Figura 21B incluye muestras que se inmunoprecipitaron con IgG apu2.07 para capturar proteínas poliubiquitinadas con enlaces K48. Ambas transferencias se tiñeron con un anticuerpo anti-RIP.

La Figura 22 representa los resultados del ensayo de ELISA de fagos descrito en el Ejemplo 4 en el que se evaluó la unión de cada clon de tercera generación apu3.01-3.12 con poliubiquitina con enlaces K48, poliubiquitina con enlaces K63, monoubiquitina y albúmina de suero bovino.

Las Figuras 23A y 23B muestran las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de cadena pesada de clones derivados de apu2.16 mutado que reconocía específicamente poliubiquitina con enlaces K63 (apu3.01-apu3.12) como se describe en el Ejemplo 4. Las figuras muestran las secuencias de HVR de cadena pesada, H1, H2 y H3. El indicador "ND" indica que la secuencia no estaba determinada. Las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. El texto sombreado indica que la secuencia es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la secuencia de HVR correspondiente en apu2.16.

Las Figuras 24A-24D representan los resultados de experimentos de transferencia de western descritos en el Ejemplo 4. La Figura 24A muestra la unión de IgG apu2.07 con tri- a heptaubiquitina con enlaces K48 inmovilizada y la ausencia de unión con tri- a heptaubiquitina o monoubiquitina con enlaces K63 inmovilizada. La Figura 24B muestra la unión de IgG apu3.07 con tri- a heptaubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y la ausencia de unión con tri- a heptaubiquitina o monoubiquitina con enlaces K48 inmovilizada. La Figura 24C muestra la unión dependiente de la concentración de IgG apu2.07 con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada y la ausencia de unión con tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada. La Figura 24D muestra la unión dependiente de concentración de IgG apu3.07 con tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y la

ausencia de unión con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada.

La Figura 25 representa los resultados de un experimento de transferencia de western descrito en el Ejemplo 4. La Figura muestra la unión de anticuerpo policlonal anti-ubiquitina, IgG apu2.07, e IgG apu3.07 con lisados inmovilizados de células 293T tratadas (+) o no tratadas (-) con Velcade®.

Las Figuras 26A-26C muestran las interacciones entre un fab específico de poliubiquitina con enlaces K63 de la invención y poliubiquitina con enlaces K63 como se determina por análisis cristalográfico. La Figura 26A representa el complejo formado entre fab específico de poliubiquitina con enlaces K63 apu2.16 y una diubiquitina con enlaces K63. Apu2.16 se muestra en diagrama de lazo en la parte inferior de la figura mientras que la diubiquitina con enlaces K63 se muestra en forma globular en la parte superior de la figura. La Figura 26B representa la superficie de diubiquitina con enlaces K63, con los restos a una distancia de 4,5 Å del fab en color gris oscuro y los restos de interés marcados. La Figura 26C representa la superficie de apu2.16 con los restos a una distancia 4,5 Å del dímero de ubiquitina con enlaces K63 coloreados en gris oscuro. Las CDR están marcadas.

Modos para llevar a cabo la invención

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", tercera edición (Sambrook *et al.*, 2001); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, ed., 1994); PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)); Harlow y Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual; "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); y "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas *et al.*, 2001).

Definiciones

Como se usan en el presente documento, los términos "ubiquitina" y "monoubiquitina" se usan de forma intercambiable, y se definen como todas las especies de ubiquitina humana y sintética nativa sustancialmente similares a una proteína de 76 aminoácidos que tiene al menos un resto de lisina en el aminoácido 6, aminoácido 22, aminoácido 27, aminoácido 29, aminoácido 33, aminoácido 48 y/o aminoácido 63.

Como se usa en el presente documento, el término "poliubiquitina" se define como todas las especies de cadenas poliméricas sintéticas y humanas nativas de ubiquitina que quedan dentro de las clases humanas y sintéticas de diferentes enlaces poliméricos de ubiquitina, incluyendo, pero sin limitación, poliubiquitina con enlaces K6, poliubiquitina con enlaces K22, poliubiquitina con enlaces K27, poliubiquitina con enlaces K29, poliubiquitina con enlaces K33, poliubiquitina con enlaces K48 y poliubiquitina con enlaces K63. La poliubiquitina puede ser de cualquier longitud, e incluye al menos al menos dos restos de ubiquitina. La poliubiquitina se distingue de repeticiones en tándem de ubiquitina que se expresan originalmente como una única proteína.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "poliubiquitina con enlaces K*" y "poliubiquitina con enlaces Lys*" son intercambiables, y se refieren a una molécula de poliubiquitina que comprende al menos un enlace isopeptídico entre el extremo C terminal de un resto de ubiquitina y una lisina en la posición * en otro resto de ubiquitina. Por ejemplo, una "poliubiquitina con enlaces K63" se usa indistintamente con una "poliubiquitina con enlaces Lys63" y ambas expresiones se refieren a una molécula de poliubiquitina que comprende un enlace isopeptídico entre el extremo C terminal de uno de los restos de ubiquitina en la molécula y la lisina en la posición 63 en otro resto de ubiquitina en la molécula.

Como se usa en el presente documento, una declaración de que un primer enlace de lisina "difiere" de un segundo enlace de lisina indica que el primer enlace de lisina entre un resto de ubiquitina y otro resto de ubiquitina implica un resto de lisina diferente (por ejemplo, K6, K22, K27, K29, K33, K48 y/o K63) que el segundo enlace de lisina entre un resto de ubiquitina y otro resto de ubiquitina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ruta de ubiquitina" se refiere a una ruta bioquímica en una célula o reconstituida *in vitro* que incluye ubiquitina y/o poliubiquitina.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Son componentes contaminantes de su ambiente natural materiales que interferirían con usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En una realización, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas realizaciones más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N terminal o interna

mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta su homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando, por ejemplo, tinción con plata o azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “anticuerpo anti-ubiquitina” y “anticuerpo anti-monoubiquitina” se usa de forma intercambiable, y se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente con una molécula de ubiquitina.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente con una molécula de poliubiquitina.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina con enlaces K48” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente con poliubiquitina con enlaces K48.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo anti-poliubiquitina con enlaces K63” se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con poliubiquitina con enlaces K63.

La expresión “sustancialmente similar”, “sustancialmente igual”, “equivalente” o “sustancialmente equivalente”, como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia considere la diferencia entre los dos valores poco o nada significativa biológica y/o estadísticamente dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd, efectos antivirales, etc.). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, menor de aproximadamente el 50 %, menor de aproximadamente el 40 %, menor de aproximadamente el 30 %, menor de aproximadamente el 20 % y/o menor de aproximadamente el 10 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

La expresión “sustancialmente reducido” o “sustancialmente diferente”, como se usa en el presente documento, indica un grado suficientemente alto de diferencia entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con una molécula y el otro asociado con una molécula de referencia/comparadora) de modo que un experto en la materia considere la diferencia entre los dos valores estadísticamente significativa dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores Kd). La diferencia entre dichos dos valores es, por ejemplo, mayor de aproximadamente el 10 %, mayor de aproximadamente el 20 %, mayor de aproximadamente el 30 %, mayor de aproximadamente el 40 % y/o mayor de aproximadamente el 50 % en función del valor para la molécula de referencia/comparadora.

La “afinidad de unión” se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A no ser que se indique de otro modo, como se usa en el presente documento, la “afinidad de unión” se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede representarse en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen con el antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen con el antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para fines de la presente invención. Se describen realizaciones ilustrativas específicas a continuación.

En una realización, el “Kd” o “valor Kd” de acuerdo con la presente invención se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (Chen, *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren placas de microtitulación (Dynex) durante una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc N° 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *et al.*, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599). El Fab de interés se incubó después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcance el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira después y la placa se lava ocho veces con Tween-20 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MicroScint-20; Packard), y las placas se recuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que proporcionan

menos de o igual al 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. De acuerdo con otra realización la K_d o valor K_d se mide usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas de CM5 con antígeno inmovilizado a aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras con dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N*-(3-dimetilamonipropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces puede determinarse la velocidad de asociación usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, pase de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo detenido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "velocidad de asociación" o " k_{on} " de acuerdo con la presente invención también puede determinarse con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con microplacas CM5 con antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan microplacas biosensoras con dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato *N*-etil-*N*-(3-dimetilamonipropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de inyección a un caudal de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones en serie dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) por ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., *et al.*, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Sin embargo, si la velocidad de asociación excede $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad de asociación puede determinarse usando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o reducción de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, pase de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2 en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo detenido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Se entiende que el término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Otro tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras introducción en la célula hospedadora, y por lo tanto se replican junto con el genoma hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos de forma operativa. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada de vector.

"Polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que puede incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación de la estructura nucleotídica puede transmitirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede

modificarse adicionalmente después de su síntesis, tal como por conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "recubrimientos terminales", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, los que tienen enlaces sin carga (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y los que tienen enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), los que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), los que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno etc.), los que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), los que contienen alquilantes, los que contienen enlaces modificados (por ejemplo, ácido nucleico alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos de hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares puede reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales para nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de recubrimiento terminal orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse con grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen en general en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares α anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilasas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos nucleosídicos básicos tales como metil ribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse por grupos de enlace alternativo. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)O', CO o CH₂ ("formacetal"), en el que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos referidos en el presente documento, incluyendo a ARN y ADN.

"Oligonucleótido" como se usa en el presente documento, generalmente se refieren a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que son en general, pero no necesariamente, de menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igual y completamente aplicable a oligonucleótidos.

Los "anticuerpos" (Ab) y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que generalmente carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan de forma intercambiable en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos monovalentes, multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos siempre que muestren la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpo (como se describe en más detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

La "región variable" o el "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino terminales de cadena pesada o ligera del anticuerpo. Estos dominios son en general las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren exhaustivamente en su secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan el marco conservado (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las regiones FR y, con las CDR de otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos

sitios de combinación de antígenos y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de y unión a antígeno completo. En una especie Fc de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. En una especie de Fv monocaténaria, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden unirse covalentemente por un enlazador peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura “dimérica” análoga de la de una especie de Fv bicaténaria. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse con un antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab’ difieren de fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la designación del presente documento para Fab’ en la que el resto o los restos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab’)2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab’ que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen en general en, por ejemplo, Abbas *et al.* Cellular and Mol. Immunology, 4^a ed. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos adicionales.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se usan de forma intercambiable en el presente documento, para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no fragmentos de anticuerpo como se definen posteriormente. Las expresiones se refieren en particular a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen la región Fc.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden solamente una parte de un anticuerpo intacto, en el que la parte conserva al menos una, y hasta la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas con esa parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y de este modo conserva la capacidad para unirse a antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como unión con FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender una rama de unión a antígeno unida con una secuencia Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica como el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos. Dicho anticuerpo monoclonal normalmente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une con una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un proceso que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a diana individual de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinantes. Debería entenderse que la secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo

monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas porque normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975); Harlow *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567), tecnologías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004)), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o de tipo humano en animales que tienen partes de o todos los loci de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, documentos WO98/24893; WO96/34096; WO96/33735; WO91/10741; Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immunol. 7: 33 (1993); Patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; Marks *et al.*, Bio.Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica de u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o de las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contiene secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, en el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalle, véase Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en los mismos: Vaswani y Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transaction 23: 1035-1038 (1995); Hurlé y Gross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994).

La expresión "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VH (H1, H2, H3), y tres en la VL (L1, L2, L3). Se usan varias delimitaciones de región hipervariable y están abarcadas en el presente documento. Las Regiones Determinantes de Complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más habitualmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mod. Biol. 196: 901-917 (1987)). Las regiones hipervariables AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se usan por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96

H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Numeración de Kabat)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Numeración de Chothia)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de las siguientes: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en el VH. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente, para cada una de estas definiciones.

Los restos de "marco conservado" o "FR" son los restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable como se definen en el presente documento.

La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y variaciones de la misma, se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pasada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO93/1161 y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se desvela en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "de afinidad madurada" es uno con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que da como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa alteración o esas alteraciones. En una realización, un anticuerpo con afinidad madurada tiene afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen por procedimientos conocidos en la técnica. Marks *et al.* Bio/Technology 10: 779-783 (1992) describe la maduración de afinidad por redistribución de dominios VH y VL. Se describe una mutagénesis aleatoria de restos de CDR y/o marco conservado en: Barbas *et al.* Proc Nat. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.* Gene 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.* J. Immunol. 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.* J. Immunol. 154(7): 3310-9 (1995); y Hawkins *et al.* J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992).

Un anticuerpo "de bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Ciertos anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficie del tratamiento con un anticuerpo de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos para tratar en el presente documento incluyen

cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la ruta de ubiquitina, trastornos inmunitarios/inflamatorios, trastornos neurológicos y otros trastornos relacionados con la ruta de ubiquitina.

Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que se asocian con algún grado de proliferación de células anómalo. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.

“Tumor”, como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásico, bien maligno o bien benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones “cáncer”, “canceroso”, “trastorno proliferativo celular”, “trastorno proliferativo” y “tumor” no son mutuamente exclusivamente como se indica en el presente documento.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracterizan normalmente por crecimiento/proliferación celular desregulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y no de Hodgkin), blastoma, sarcoma, y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salivar, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, leucemia y otros trastornos linfoproliferativos, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

La expresión “trastorno muscular” se refiere a o describe la afección fisiológica en animales que contienen músculos que se caracterizan normalmente por deterioro o debilitamiento del músculo esquelético y/o liso de modo que la función muscular normal se reduce significativamente. Los ejemplos de trastornos musculares incluyen, pero sin limitación, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Isaac; síndrome de la persona rígida; parálisis periódicas familiares, miopatía, miotonía, rabdomiolisis, atrofia muscular y diversos tipos de debilidad muscular y rigidez muscular.

La expresión “trastorno genético relacionado con la ruta de la ubiquitina” se refiere a o describe un trastorno basado en la genética que se caracteriza normalmente por o al que contribuye el funcionamiento aberrante de la ruta de ubiquitina. Los ejemplos de trastornos genéticos relacionados con la ruta de ubiquitina incluyen, pero sin limitación, fibrosis quística, síndrome de Angelman y síndrome de Liddle.

Las expresiones “trastorno neurológico” o “enfermedad neurológica” se refieren a o describen una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central y/o periférico en mamíferos que se caracteriza normalmente por el deterioro del tejido nervioso o el deterioro de la comunicación entre células en el tejido nervioso. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, enfermedades neurodegenerativas (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de cuerpos de Lewy, síndrome postpoliomielítico, síndrome de Shy-Draeger, atrofia olivopontocerebelar, enfermedad de Parkinson, atrofia sistémica múltiple, degeneración estriatonigral, tauopatías (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer y parálisis supranuclear), enfermedades priónicas (incluyendo, pero sin limitación, encefalopatía espongiiforme bovina, tembladera, síndrome de Creutzfeldt-Jakob, kuru, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, enfermedad de debilitamiento crónico e insomnio familiar letal), parálisis bulbar, enfermedad de las neuronas motoras y trastornos heterodegenerativos del sistema nervioso (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Canavan, enfermedad de Huntington, ceroidlipofuscinosis neuronal, enfermedad de Alexander, síndrome de Tourette, síndrome del cabello ensortijado de Menkes, síndrome de Cockayne, síndrome de Halervorden-Spatz, enfermedad de lafora, síndrome de Rett, degeneración hepatolenticular, síndrome de Lesch-Nyhan y síndrome de Unverricht-Lundborg), demencia (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Pick y ataxia espinocerebelar).

Las expresiones “trastorno inflamatorio” y “trastorno inmunitario” se refieren a o describen trastornos provocados por mecanismos inmunológicos aberrantes y/o señalización de citocinas aberrantes. Los ejemplos de trastornos inflamatorios e inmunitarios incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, síndromes de deficiencia inmunológica, e hipersensibilidad. Una “enfermedad autoinmunitaria” en el presente documento es una enfermedad o un trastorno no maligno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de un individuo. Las enfermedades autoinmunitarias en el presente documento excluyen específicamente enfermedades o afecciones cancerosas o malignas, excluyendo especialmente linfoma de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia por tricoleucitos y leucemia mieloblástica crónica. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunitarios incluyen, pero sin limitación, respuestas inflamatorias tales como enfermedades cutáneas inflamatorias incluyendo psoriasis y dermatitis (por ejemplo, dermatitis atópica); esclerodermia sistémica y esclerosis; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa); síndrome de dificultad respiratoria (incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto; SDRA); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; colitis; glomerulonefritis; afecciones alérgicas tales como eccema y asma y otras afecciones que implican infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas; aterosclerosis; deficiencia de adhesión de leucocitos; artritis reumatoide; lupus eritematoso sistémico (SLE) (incluyendo pero sin limitación nefritis lúpica, lupus cutáneo); diabetes mellitus (por ejemplo diabetes mellitus de Tipo I o diabetes mellitus

insulinodependiente); esclerosis múltiple; síndrome de Reynaud; y tiroiditis autoinmunitaria; tiroiditis de Hashimoto; encefalomiелitis alérgica; síndrome de Sjogren; diabetes de aparición juvenil; y respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T normalmente hallada en tuberculosis, sarcoidosis, polimiositis, granulomatosis y vasculitis; anemia perniciosa (enfermedad de Addison); enfermedades que implican diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC); síndrome de lesión orgánica múltiple; anemia hemolítica (incluyendo, pero sin limitación crioglobulinemia o anemia positiva de Coombs); miastenia grave; enfermedades mediadas por complejo antígeno-anticuerpo; enfermedad de membrana basal antiglomerular; síndrome antifosfolípido; neuritis alérgica; enfermedad de Graves; síndrome miasténico de Lambert-Eaton; penfigoide ampolloso; pénfigo; poliendocrinopatías autoinmunitarias; enfermedad de Reiter; síndrome de la persona rígida; enfermedad de Behcet; arteritis de células gigantes; nefritis compleja inmunitaria; nefropatía de IgA; polineuropatías de IgM; púrpura trombocitopénica inmunitaria (ITP) o trombocitopenia autoinmunitaria, etc.

Los ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero sin limitación, ataxia telangiectasia, síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos, linfopenia, disgammaglobulinemia, infecciones por VIH o delta retrovirus, inmunodeficiencia variable común, inmunodeficiencia combinada grave, disfunción bactericida fagocítica, agammaglobulinemia, síndrome de Di-George y síndrome de Wiskott-Aldrich. Los ejemplos de hipersensibilidad incluyen, pero sin limitación, alergias, asma, dermatitis, urticaria, anafilaxis, síndrome de Wissler y púrpura trombocitopénica.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo o célula que se trata, y puede realizarse bien para profilaxis o bien durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen prevención de la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevenir o reducir la inflamación y/o daño tisular/orgánico, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos de la invención para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Un "individuo" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales de granja (tales como vacas), animales deportivos, mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, ratones y ratas. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un ser humano.

"Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. En ciertas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. normalmente pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como nucleoliticenzimas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente. Otros agentes citotóxicos se describen posteriormente. Un agente tumoricida provoca la destrucción de células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales tiotepa y ciclofosfamida CITOXAN®; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN™), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina

y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas del nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticas de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1 y caliqueamicina omega1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediina de cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; regenerador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de paclitaxel en nanopartículas modificado técnicamente con albúmina, sin Cremophor ABRAXANETM (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA®); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATINTM) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer, y están con frecuencia en forma de tratamiento sistémico o de cuerpo completo. Pueden ser en sí mismas hormonas. Los ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógeno selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno EVISTA®, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); agentes que actúan para suprimir o detener el funcionamiento de los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) tales como LUPRON® y acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID® o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como vacunas THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®, rmRH ABARELIX®, ditosilato de lapatinib (una molécula pequeña inhibidora de tirosina quinasa doble EGFR y ErbB-2 también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Composiciones y métodos para prepararlas

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente con poliubiquitina, pero no con monoubiquitina. Más específicamente, se proporcionan anticuerpos que son capaces de unirse específicamente con una poliubiquitina que comprende un primer enlace de lisina pero no con una poliubiquitina que comprende un segundo enlace de lisina, diferente, como se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 1-25, 81-89, 151-175, 229-239, 265-279, 329-336, 392-459, 599-629, 695-704, 739-748 y 789-799. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de región HVR-H1 seleccionada de las SEC ID N°: 26, 90, 176, 240, 280, 337, 460, 630, 705, 749 y 800. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 27-51, 91-99, 177-201, 241-251, 281-295, 338-345, 461-528, 631-661, 706-715, 750-759 y 801-811. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de región HVR-H2 seleccionada de las SEC ID N°: 52, 100, 202, 252, 296, 346, 529, 662, 716, 760 y 812. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H3 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 53-77, 101-109, 203-227, 253-263, 297-311, 347-354, 530-597, 663-693, 717-726, 761-770 y 813-823. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de región HVR-H3 seleccionada de SEC ID N°: 78, 110, 228, 264, 312, 355, 598, 694, 727, 771 y 824.

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 1-26, 81-90, 151-176, 229-240, 265-280, 329-337, 392-460, 599-630, 695-705, 739-749 y 789-800, y una región HVR-H2 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 27-52, 91-100, 177-202, 241-252, 281-296, 338-346, 461-529, 631-662, 706-716, 750-760 y 801-812. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H1 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 1-26, 81-90, 151-176, 229-240, 265-280, 329-337, 392-460, 599-630, 695-705, 739-749 y 789-800, y una región HVR-H3 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 53-78, 101-110, 203-228, 253-264, 297-312, 347-355, 530-598, 663-694, 717-727, 761-771 y 813-824. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-H2 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID NO: 27-52, 91-100, 177-202, 241-252, 281-296, 338-346, 461-529, 631-662, 706-716, 750-760 y 801-812, y una región HVR-H3 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 53-78, 101-110, 203-228, 253-264, 297-312, 347-355, 530-598, 663-694, 717-727, 761-771 y 813-824.

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-L3 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 313-327, 356-363, 728-737 y 772-781. En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una secuencia consenso de región HVR-L3 seleccionada de las SEC ID N°: 328, 364, 738 y 782. En una realización, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende una región HVR-L3 que comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID N°: 313-328, 356-364, 728-738 y 772-782, y que comprende además al menos una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 o HVR-H3 seleccionada de las SEC ID N°: 1-26, 81-90, 151-176, 229-240, 265-280, 329-337, 392-460, 599-630, 695-705, 739-749 y 789-800; SEC ID N°: 27-52, 91-100, 177-202, 241-252, 281-296, 338-346, 461-529, 631-662, 706-716, 750-760 y 801-812; y SEC ID N°: 53-78, 101-110, 203-228, 253-264, 297-312, 347-355, 530-598, 663-694, 717-727, 761-771 y 813-824, respectivamente.

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o las cuatro de las siguientes:

- (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 1-26, 81-90, 151-176, 229-240, 265-280, 329-337, 392-460, 599-630, 695-705, 739-749 y 789-800;
- (ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 27-52, 91-100, 177-202, 241-252, 281-296, 338-346, 461-529, 631-662, 706-716, 750-760 y 801-812;
- (iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 53-78, 101-110, 203-228, 253-264, 297-312, 347-355, 530-598, 663-694, 717-727, 761-771 y 813-824;
- (iv) una secuencia de HVR-L3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 313-328, 356-364, 728-738 y 772-782.

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida, que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o las cuatro de las siguientes:

- (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 1-26, 151-176, 265-280, 392-460 y 695-705;
- (ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 27-52, 177-202, 281-

296, 461-529 y 706-716;

(iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 53-78, 203-228, 297-312, 530-598 y 717-727; y

(iv) una secuencia de HVR-L3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 313-328 y 728-738.

5

En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona un anticuerpo que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida, que comprende al menos una, al menos dos, al menos tres o las cuatro de las siguientes:

10 (i) una secuencia de HVR-H1 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 81-90, 229-240, 329-337, 599-630, 739-749 y 789-800;

(ii) una secuencia de HVR-H2 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 91-100, 241-252, 338-346, 631-662, 750-760 y 801-812;

15 (iii) una secuencia de HVR-H3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 101-110, 253-264, 347-355, 663-694, 761-771 y 813-824;

(iv) una secuencia de HVR-L3 que comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 356-364 y 772-782.

20 Las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 1-78, 81-106-149, 151-364, 392-782 y 789-824 se enumeran con respecto a HVR individuales (es decir, H1, H2, H3, L3) como se indica en las Figuras 2, 3, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17 y 22, siendo la numeración coherente con el sistema de numeración de Kabat como se describe posteriormente. En una realización, un anticuerpo comprende, una, dos, tres o todas de las secuencias de HVR de (i)-(iv) anteriores, y HVR-L1 y/o HVR-L2 que comprenden una secuencia consenso de Kabat (por ejemplo, SEC ID N°: 79 (HVR-L1) y 80 (HVR-L2)).

25 En un aspecto, la divulgación del presente documento proporciona anticuerpos que comprenden secuencias de HVR de cadena pesada como se representa en las Figuras 2, 3, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17 y 22. En una realización, los anticuerpos comprenden además secuencias de HVR de cadena ligera como se representa en las Figuras 10, 11, 16 y 17.

30 Algunas realizaciones de anticuerpos comprenden un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo 4D5 humanizado (huMAb4D5-8) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos) (también referido en la Patente de Estados Unidos N° 6.407.213 y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93) como se representa en la SEC ID N°: 783 a continuación.

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

35 **Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly**

Gln Gly Thr Lys Val Gly Ile Lys 107 (SEC ID N°: 783) (los restos de HVR están subrayados)

40 En una realización, la secuencia de dominio variable de cadena ligera de huMAb4D5-8 se modifica en una o más de las posiciones 28, 30, 31, 53, 66 y 91 (Asp, Asn, Thr, Phe, Arg e His como se ha indicado en negrita/cursiva anteriormente, respectivamente). En una realización, la secuencia de huMAb4D5-8 modificada comprende Ser en la posición 28, Ser en la posición 30, Ser en la posición 31, Ser en la posición 53, Gly en la posición 66 y/o Ser en la posición 91. En consecuencia, en una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia representada en la SEC ID N°: 784 a continuación:

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val

45 **Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys**

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 107 (SEC ID N°: 784) (los restos de HVR están subrayados).

Los restos sustituidos con respecto a huMAb4D5-8 están indicados en negrita/cursiva anteriormente.

50

Los anticuerpos pueden comprender cualquier secuencia de dominio variable de marco conservado adecuada, siempre que se conserve sustancialmente la actividad de unión con poliubiquitina incluyendo un enlace de lisina particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden una secuencia consenso de marco conservado de cadena pesada de subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de marco conservado comprende sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias marco conservadas de dominio variable de cadena pesada de huMab4D5-8 (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos) (también referido en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93). En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de marco conservado de cadena ligera kl humana. En una realización, estos anticuerpos comprenden al menos una, dos o todas las secuencias de HVR de cadena ligera de SEC ID Nº: 79, 80, 313-328, 356-364, 728-738 y 772-78. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de HVR de cadena ligera de huMab4D5-8 como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.407.213 y 5.821.337. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de dominio variable de cadena ligera de huMab4D5-8 (SEC ID Nº: 783 y 784) (HERCEPTIN®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, Estados Unidos) (también referido en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.407.213 y 5.821.337, y Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93).

En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID Nº: 111-129, 138-141, 146-149 y 839-895, y se seleccionan secuencias de HVR H1, H2 y H3 de al menos una de las SEC ID Nº: 1-26, 81-90, 151-176, 229-240, 265-280, 329-337, 392-460, 599-630, 695-705, 739-749 y 789-800; 27-52, 91-100, 177-202, 241-252, 281-296, 338-346, 461-529, 631-662, 706-716, 750-760 y 801-812; y 53-78, 101-110, 203-228, 253-264, 297-312, 347-355, 530-598, 663-694, 717-727, 761-771 y 813-824, respectivamente. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende la secuencia de al menos una de las SEC ID Nº: 130-133, 134-137, 142-145 y 896-907, la secuencia de HVR-L1 es SEC ID Nº: 79, la secuencia de HVR-L2 es SEC ID Nº: 80, y la secuencia de HVR-L3 se selecciona de al menos una de SEC ID Nº: 313-328, 356-364, 728-738 y 772-782.

En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una de las SEC ID Nº: 11-129 y 839-895, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son las SEC ID Nº: 1, 27 y 53, respectivamente (clon 48-1). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los clones 48-2 hasta 48-118, clones 63-1 hasta 63-51, Fab apu01 hasta apu24, Fab apu2.01 hasta apu2.20, y clones apu3.01 hasta 3.11 comprenden un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de las SEC ID Nº: 111-129 y 839-895, y las secuencias de HVR-H1, HVR-H2, y HVR-H3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada clon o Fab en las Figuras 2, 3, 8-11, 14-17 y 22. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de las SEC ID Nº: 130-133 y 896-907, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEC ID Nº: 79, 80 y 313, respectivamente (Fab apu01). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los Fab apu01 hasta apu24 y Fab apu2.01 hasta apu2.20 comprenden un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de SEC ID Nº: 130-133 y 896-907 y HVR-L1 es SEC ID Nº: 79, HVR-L2 es SEC ID Nº: 80 y las secuencias de HVR-L3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada Fab en las Figuras 10, 11C, 16B y 17B.

En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de las SEC ID Nº: 138-141, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son las SEC ID Nº: 1, 27 y 53, respectivamente (clon 48-1). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los clones 48-2 hasta 48-118, clones 63-1 hasta 63-51, Fab apu01 hasta apu24, Fab apu2.01 hasta apu2.20, y clones apu3.01-3.11 comprenden un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de SEC ID Nº: 138-141 y las secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada clon o Fab en las Figuras 2, 3, 8-11, 14-17 y 22. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de SEC ID Nº: 134-137, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEC ID Nº: 79, 80 y 313, respectivamente (Fab apu01). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los Fab apu01 hasta apu24 y Fab apu2.01 hasta apu2.20 comprenden un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de las SEC ID Nº: 134-137 y HVR-L1 es SEC ID Nº: 79, HVR-L2 es SEC ID Nº: 80 y las secuencias de HVR-L3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada Fab en las Figuras 10, 11C, 16B y 17B.

En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de SEC ID Nº: 146-149, y las secuencias de HVR H1, H2 y H3 son SEC ID Nº: 1, 27 y 53, respectivamente (clon 48-1). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los clones 48-2 hasta 48-118, clones 63-1 hasta 63-51, Fab apu01 hasta apu24, Fab apu2.01 hasta apu2.20, y clones apu3.01 hasta 3.11 comprenden un dominio variable de cadena pesada, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de la SEC ID Nº: 146-149 y las secuencias de HVR-H1, HVR-H2, y

HVR-H3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada clon o Fab en las Figuras 2, 3, 8-11, 14-17 y 22. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de la SEC ID N°: 142-145, y las secuencias de HVR L1, L2 y L3 son las SEC ID N°: 79, 80 y 313, respectivamente (Fab apu01). De forma similar, en otras realizaciones, los anticuerpos de cada uno de los Fab apu01 hasta apu24 y Fab apu2.01 hasta apu2.20 comprenden un dominio variable de cadena ligera, en el que la secuencia marco conservada comprende al menos una secuencia de las SEC ID N°: 142-145, y HVR-L1 es SEC ID N°: 79, HVR-L2 es SEC ID N°: 80 y las secuencias de HVR-L3 son las secuencias enumeradas específicamente para cada Fab en las Figuras 10, 11C, 16B y 17B.

En una realización, se madura la afinidad de un anticuerpo para obtener la afinidad de unión a diana deseada. En un ejemplo, un anticuerpo de afinidad madurada del que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H1 29, 30, 33 y 34. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H2 52 y 52a. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H3 99, 100, 100a y 100b. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos HVR-H3 95-100, 100a y 100b. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K63 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-L3 91 y 96. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H1 29-34. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H2 50, 52, 52a, 53-56 y 58. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H3 95-100, 100a, 100b y 100c. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-L3 91-95, 95a y 95b.

En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H1 29-34. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H2 50, 52, 54, 56 y 58. En otro ejemplo, un anticuerpo con afinidad madurada que se une específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 con alta afinidad pero se une con poliubiquitina con enlaces K48 con afinidad sustancialmente reducida comprende sustitución en las posiciones de aminoácidos de HVR-H3 95-100, 100a, 100b y 100c.

En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de las SEC ID N°: 265, 281 y 297. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de las SEC ID N°: 79, 80 y 313. En una realización, un anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de las SEC ID N°: 265, 281 y 297 y también comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de las SEC ID N°: 79, 80 y 313. En otras realizaciones, un anticuerpo correspondiente a un número de clon particular comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se expone en las Figuras 2, 3, 8, 9, 10, 11, 14-17 y 22 para ese número de clon. En otras realizaciones, un anticuerpo correspondiente a un número de clon particular comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80 y una secuencia de HVR-L3 como se expone en las Figuras 10, 11, 16 y 17 para ese número de clon. En otras realizaciones, un anticuerpo correspondiente a un número de clon particular comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se expone en las Figuras 2, 3, 8, 9, 10, 11, 14-17 y 22 para ese número de clon y también comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de HVR-L1 de SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 de SEC ID N°: 80 y una secuencia de HVR-L3 como se expone en las Figuras 10, 11, 16 y 17 para ese número de clon.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados por la unión con poliubiquitina. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo que se une con el mismo determinante antigénico en poliubiquitina que cualquiera de los anticuerpos anteriormente

5 mencionados.

Como se muestra en el presente documento, los anticuerpos se unen específicamente con una poliubiquitina aislada que tiene un enlace de lisina específico. Como se muestra en el presente documento, los anticuerpos también se unen específicamente con poliubiquitina que tiene un enlace de lisina específico cuando esa poliubiquitina se une con una proteína heteróloga (véase, por ejemplo, Ejemplos 3 y 4).

Se proporcionan composiciones que comprenden al menos un anticuerpo anti-poliubiquitina o al menos un polinucleótido que comprende secuencias que codifican un anticuerpo anti-poliubiquitina. En ciertas realizaciones, una composición puede ser una composición farmacéutica. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen con una o más poliubiquitinas y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen con una o más poliubiquitinas. Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica.

También se proporcionan anticuerpos y polinucleótidos aislados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y polinucleótidos aislados son sustancialmente puros.

En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina son monoclonales. En otra realización, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos anti-poliubiquitina (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab'-SH y F(ab')₂). Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos, humanizados o humanos. Estos fragmentos son útiles para los fines de diagnóstico y terapéuticos expuestos posteriormente.

Generación de anticuerpos anti-poliubiquitina usando una biblioteca de presentación de fagos

Se conocen en la técnica diversos métodos para generar bibliotecas de presentación de fagos de las que puede obtenerse un anticuerpo de interés. Un método para generar anticuerpos de interés es mediante el uso de una biblioteca de anticuerpos de fagos como se describe en Lee *et al.*, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para explorar con respecto a clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o las actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionada con la proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se seleccionan por cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse con el antígeno deseado se adsorben con el antígeno y de este modo se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones de unión se eluyen después del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Puede obtenerse cualquiera de los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención diseñando un procedimiento de exploración de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de construcción de un clon de anticuerpo anti-poliubiquitina de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de región constante adecuadas (Fc) descritas en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

El dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden presentarse funcionalmente en fagos, bien como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL se unen covalentemente mediante un péptido flexible, corto o como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interaccionan de forma no covalente, como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fagos que codifican scFv y clones de fagos que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fagos Fv" o "clones de Fv".

Pueden clonarse por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, que pueden después explorarse con respecto a clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin el requisito de construir hibridomas. Como alternativa, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para una amplia serie de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como se describe en Griffiths *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Finalmente, también pueden prepararse bibliotecas sin tratamiento previo de forma sintética clonando los segmentos de genes V no reordenados de células madre, y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y para conseguir el reordenamiento *in vitro* como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Se usan fagos filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden presentarse como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL se conectan en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta al periplasma de la célula hospedadora bacteriana donde se ensambla una estructura proteica de recubrimiento Fab que se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo silvestre, por ejemplo como se describe en Hoogenboom *et al.*, Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, se obtienen ácidos nucleicos que codifican fragmentos génicos de anticuerpos de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca desviada en favor de los clones anti-poliubiquitina, el sujeto se inmuniza con poliubiquitina para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan células del bazo y/o linfocitos B en circulación u otros linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de bibliotecas. En una realización, se obtiene una biblioteca de fragmentos génicos de anticuerpos humanos desviadas en favor de clones anti-poliubiquitina humana generando una respuesta de anticuerpo anti-poliubiquitina humana en ratones transgénicos que portan una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcional) de modo que la inmunización de poliubiquitina da lugar a linfocitos B que producen anticuerpos humanos contra poliubiquitina. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe en la Sección (III)(b) posterior.

Puede obtenerse enriquecimiento adicional para poblaciones celulares reactivas anti-poliubiquitina usando un procedimiento de exploración adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpos unidos a membrana específicos de poliubiquitina, por ejemplo, por separación celular con cromatografía de afinidad de poliubiquitina o adsorción de células con poliubiquitina marcada con fluorocromo seguido de separación de células activadas por flujo (FACS).

Como alternativa, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que la poliubiquitina no sea antigénica. Para bibliotecas que incorporan construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se recogen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse de diversas especies animales, tales como especies humana, ratón, rata, lagomorfos, lupinas, caninas, felinas, porcinas, bovinas, equinas y aves, etc.

Se recuperan ácidos nucleicos que codifican segmentos génicos variables de anticuerpo (incluyendo segmentos VH y VL) de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coinciden con los extremos 5' y 3' de genes VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo repertorios de genes V diversos para expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, puede incorporarse degradación en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En ciertas realizaciones, la diversidad de las bibliotecas se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V para amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el método de Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum *et al.*, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, pueden introducirse sitios de restricción poco habituales dentro del cebador de PCR como un marcador en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o por aplicación por PCR adicional con un cebador marcado como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los elementos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (presentado en Tomlinson *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), y se han mapeado (presentado en Matsuda *et al.*, Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales de los bucles H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles de H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). También pueden prepararse repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado segmentos de V κ y V λ humanos (presentado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para preparar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basándose en una serie de pliegues VH y VL, y longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural

considerable. Después de la amplificación de ADN que codifican genes V, los segmentos de genes V de línea germinal pueden reordenarse *in vitro* de acuerdo con los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

5 Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios de genes VH y VL entre sí de varias maneras. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de los fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratamiento previo se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Las dos bibliotecas se combinan después por infección de fagos de bacterias que contienen fagémidos de modo que cada célula contenga una diferente combinación y el tamaño de la biblioteca se limita solamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes VH y VL se recombinan en un único replicón y se empaquetan juntos en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

20 Como alternativa, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y después clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). También puede usarse ensamblaje por PCR para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenario (scFv). En otra técnica más, se usa "ensamblaje por PCR en células" para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y después clonar repertorios de genes unidos como se describe en Embleton *et al.*, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

30 Puede conseguirse exploración de las bibliotecas por cualquier técnica conocida en este campo. Por ejemplo, la poliubiquitina puede usarse para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse en células hospedadoras fijadas a placas de adsorción o usarse en clasificación celular, o conjugarse con biotina para captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para seleccionar en bibliotecas de presentación de fagos.

35 Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con poliubiquitina inmovilizada en condiciones adecuadas para unir al menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similares se seleccionan para imitar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos con la fase sólida se lavan y después se eluyen por ácido, por ejemplo como se describe en Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o por álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o por competición con antígeno de poliubiquitina, por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígeno de Nature, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1000 veces en un único ciclo de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a ciclos adicionales de selección.

45 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago pueden interaccionar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) pueden retenerse mediante el uso de lavados cortos, presentación de fagos multivalentes y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no solamente estabiliza el fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece la nueva unión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede promoverse mediante el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalentes como se describe en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992).

55 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, por poliubiquitina. Sin embargo, la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de afinidad descritas anteriormente) probablemente dé lugar a muchos mutantes, la mayoría de unión a antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con poliubiquitina limitante, podría superarse por competición al fago de alta afinidad poco común. Para conservar todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos pueden incubarse con exceso de poliubiquitina biotinilada, pero con la poliubiquitina biotinilada a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para poliubiquitina. Los fagos de unión de alta afinidad pueden después capturarse por perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen de acuerdo con sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con tan poco como una afinidad dos veces mayor a partir de un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para diferenciar basándose en la cinética de disociación.

Los clones anti-poliubiquitina pueden seleccionarse por actividad. En una realización, la invención proporciona anticuerpos anti-poliubiquitina que bloquean la unión entre un ligando de poliubiquitina y poliubiquitina, pero no bloquean la unión entre un ligando de poliubiquitina y una segunda proteína. Los clones de Fv correspondientes a dichos anticuerpos anti-poliubiquitina pueden seleccionarse (1) aislando clones anti-poliubiquitina de una biblioteca de fagos como se ha descrito en la sección B(l)(2) anterior, y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fagos haciendo crecer la población en un hospedador bacteriano adecuado; (2) seleccionando poliubiquitina y una segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y no de bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fagos anti-poliubiquitina con poliubiquitina inmovilizada; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon indeseado que reconozca determinantes de unión a poliubiquitina que solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos después de la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no de bloqueo deseadas pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo los procedimientos de selección descritos en el presente documento una o más veces.

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención se aísla y secuencía fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo usando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de interés de cadena pesada y ligera de hibridoma o molde de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de cadena pesada y/o de cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas puedan obtenerse de Kabat *et al.*, mencionado anteriormente) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud parcial o completa. Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como ser humano) y fusionado después con ADN de región constante de otra especie animal para formar secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa, "híbrida", se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En una realización, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN de región constante humana para formar una secuencia o secuencias codificantes para todas las cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial humanas.

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (bien naturales o bien sintéticos) pueden ser de afinidad moderada (k_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y volviendo a seleccionar a partir de bibliotecas secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), mencionado anteriormente. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a errores (presentada en Leung *et al.*, Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, puede realizarse maduración de afinidad mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo usando PCR con cebadores que portan secuencia aleatoria que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y explorando con respecto a clones de mayor afinidad. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un método para inducir mutagénesis en una región determinante de complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados por presentación de fagos con repertorios de variantes de dominio V de origen natural obtenidas de donantes no inmunizados y explorar con respecto a mayor afinidad en varios ciclos de redistribución de cadena como se describe en Marks *et al.*, Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de 10^{-9} M.

Otros métodos para generar anticuerpos anti-poliubiquitina

Se conocen bien en la técnica otros métodos para generar y evaluar la afinidad de los anticuerpos y se describen, por ejemplo, en Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975); Patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986; Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.* Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987; Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980); Engels *et al.*, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989); Abrahmsen *et al.*, EMBO J., 4: 3901 (1985); Methods in Enzymology, vol. 44 (1976); Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984).

Métodos generales

En general, la invención proporciona anticuerpos anti-poliubiquitina que son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por poliubiquitina en los que se desea un bloqueo parcial o total de una o más actividades de poliubiquitina. En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención se usan para tratar cáncer. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en el presente documento se usan para tratar trastornos musculares, tales como los indicados anteriormente. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en el presente documento se usan para tratar trastornos neurológicos tales como los indicados anteriormente. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en el presente documento se usan para tratar enfermedades genéticas. En otra realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en el presente documento se usan para tratar trastornos inmunitarios/inflamatorios.

Las propiedades únicas de los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención los hacen particularmente útiles para distinguir entre diferentes formas con enlaces de lisina de poliubiquitina en un sistema celular sin recurrir a manipulación genética incómoda y cara o métodos biofísicos tales como espectrometría de masas. Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden usarse para caracterizar la función o las funciones y actividades de poliubiquitinas con enlaces de lisina tanto *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención también puede usarse para determinar el papel de poliubiquitinas con enlaces de lisina específicas en el desarrollo y patogénesis de la enfermedad. Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden usarse adicionalmente para tratar enfermedades en las que una o más poliubiquitinas con enlaces de lisina específicas se regulan de forma aberrante o actúan de forma aberrante sin interferir con la actividad normal de poliubiquitinas para las que los anticuerpos anti-poliubiquitina no son específicos.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención encuentran utilidad como reactivos para detección y aislamiento de poliubiquitina de enlaces de lisina específicos, tales como detección de poliubiquitina en diversos tipos celulares y tejidos, incluyendo la determinación de la densidad y distribución de poliubiquitina en poblaciones celulares y dentro de una célula dada, y clasificación celular basada en la presencia o cantidad de poliubiquitina.

En otro aspecto más, los presentes anticuerpos anti-poliubiquitina son útiles para el desarrollo de antagonistas de poliubiquitina con patrones de actividad de bloqueo similares a los de los anticuerpos objeto de la invención. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K48 de la invención para determinar e identificar otros anticuerpos que tienen las mismas características de unión a poliubiquitina con enlaces K48 y/o capacidades para bloquear las rutas mediadas por poliubiquitina con enlaces K48. De forma similar, pueden usarse anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K63 de la invención para determinar e identificar otros anticuerpos que tienen las mismas características de unión con poliubiquitina con enlaces K63 y/o capacidades para bloquear las rutas mediadas por poliubiquitina con enlaces K63.

Como un ejemplo más, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden usarse para identificar otros anticuerpos anti-poliubiquitina que se unen sustancialmente con el mismo determinante o los mismos determinantes antígenicos de poliubiquitina que los anticuerpos ejemplificados en el presente documento, incluyendo epítomos lineales y conformacionales.

Los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden usarse en ensayos basados en las rutas fisiológicas en las que la poliubiquitina está implicada para explorar con respecto a moléculas pequeñas antagonistas de poliubiquitina que tienen uno o más enlaces de lisina específicos que mostrarán efectos farmacológicos similares en el bloqueo de la unión de uno o más compañeros de unión con poliubiquitina que tiene esos uno o más enlaces de lisina. Por ejemplo, se sabe que la poliubiquitina con enlaces K48 está implicada en la degradación proteasómica dirigida de ciertas proteínas (véase, por ejemplo, Chau *et al.*, Science 243: 1576-1583 (1989); Finley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick *et al.*, Nat. Cell. Biol. 6: 634-641 (2004)); por lo tanto pueden usarse anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K48 en exploraciones para identificar moléculas pequeñas antagonistas de la degradación proteasómica dirigida mediada por poliubiquitina con enlaces K48 comparando la actividad de una o más moléculas pequeñas antagonistas potenciales con la actividad de los anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K48 en esa ruta. De forma similar, en otro ejemplo, se sabe que la poliubiquitina con enlaces K63 está implicada en la reparación de ADN (véase, por ejemplo, Pickart y Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004)), y por lo tanto la actividad de anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K63 para antagonizar una ruta de reparación de ADN puede compararse con la actividad de una o más moléculas pequeñas antagonistas potenciales de la poliubiquitina con enlaces K63 en la misma ruta de reparación de ADN. De forma similar, en otro ejemplo, se sabe que la poliubiquitina con enlaces K63 está implicada en la formación de cuerpos de Lewy en enfermedad de Parkinson (véase, por ejemplo, Lim *et al.*, J. Neurosci. 25(8): 2002-9 (2005)), y por lo tanto la actividad de los anticuerpos anti-poliubiquitina con enlaces K63 para antagonizar la formación de cuerpos de Lewy puede compararse con la actividad de una o más moléculas pequeñas antagonistas potenciales de poliubiquitina con enlaces K63 en la antagonización de la formación de cuerpos de Lewy.

Puede conseguirse generación de anticuerpos candidatos usando técnicas rutinarias en este campo, incluyendo las descritas en el presente documento, tales como la técnica de hibridoma y exploración de bibliotecas de presentación en fagos de moléculas de unión. Estos métodos están bien establecidos en la técnica.

Brevemente, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse usando bibliotecas combinatorias para explorar con respecto a clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o las actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan explorando bibliotecas de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de región variable de anticuerpo (Fv) fusionada con proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se seleccionan por cromatografía de afinidad con respecto al antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos Fv capaces de unirse con el antígeno deseado se adsorben en el antígeno y de este modo se separan de los clones no de unión en la biblioteca. Los clones de unión se eluyen después del antígeno, y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Puede obtenerse cualquiera de los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención diseñando un procedimiento de exploración de antígenos adecuado para seleccionar con respecto al clon de fago de interés seguido de construcción de un clon de anticuerpo anti-poliubiquitina de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Véase también Pub. PCT WO03/102157 y referencias citadas en la misma.

En una realización, los anticuerpos anti-poliubiquitina de la invención son monoclonales. También están abarcados dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂, y variaciones de los mismos, de los anticuerpos anti-poliubiquitina proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpo pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser quiméricos, humanos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines experimentales, de diagnóstico y terapéuticos expuestos en el presente documento.

Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica como el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos monoclonales anti-poliubiquitina de la invención pueden prepararse usando diversos métodos conocidos en la técnica, incluyendo el método de hibridoma descrito por primera vez en Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o como alternativa pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

Vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes

Para producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y se secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula hospedadora que se use. Las células hospedadoras incluyen, pero sin limitación, células de origen procariota o eucariota (generalmente de mamíferos). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras procariotas

Construcción de vectores

Pueden obtenerse secuencias polinucleotídicas que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención usando técnicas recombinantes convencionales. Pueden aislarse y secuenciarse secuencias polinucleotídicas deseadas a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Como alternativa, pueden sintetizarse polinucleótidos usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariotas. Muchos vectores que están disponibles y se conocen en la técnica pueden usarse para el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos para insertar en el vector y la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión del polinucleótido heterólogo, o ambas) y su compatibilidad con la célula hospedadora particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen en general, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosomas (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora en relación con estos hospedadores. El vector porta habitualmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar selección fenotípica en

células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (tet) y de este modo proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para expresión de proteínas endógenas. Se describen ejemplos de derivados de pBR322 usados para expresión de anticuerpos particulares en detalle en Carter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.648.237.

Además, pueden usarse vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador como vectores transformantes en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, pueden utilizarse bacteriófagos tales como λ GEM.TM.-11 en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada cadena arriba (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente quedan en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente con ADN cistrónico que codifica la cadena ligera o pesada retirando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general mayor transcripción y mayores rendimientos de gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o el *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como promotores bacterianos o de fagos conocidos). Sus secuencias de nucleótidos se han publicado, permitiendo de este modo a un experto ligarlos operativamente con cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist *et al.* (1980) Cell 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para proporcionar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de secreción que dirige la traslocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el fin de la presente invención debería ser una que se reconozca y se procese (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de consiste en los líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina termoestable II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencia señal STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas de acuerdo con la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por lo tanto no requiere la presencia de secuencias señales de secreción dentro de cada cistrón. A este respecto, se expresan cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas de *E. coli* *trxB*-) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo de este modo el plegamiento apropiado y el ensamblaje de subunidades proteicas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

También pueden producirse anticuerpos de la invención usando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de componentes polipeptídicos expresados puede modularse para maximizar el rendimiento de anticuerpos ensamblados apropiadamente y secretados de la invención. Dicha modulación se consigue al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas traduccionales para los componentes polipeptídicos.

Se desvela una técnica para modular la fuerza traduccional en Simmons *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.840.523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, puede crearse una serie de variantes de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico con un intervalo de fuerzas traduccionales, proporcionando de este modo un medio conveniente por el que ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Pueden generarse variantes de TIR por técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios codónicos que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En

ciertas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o espaciado de secuencias Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia señal. Un método para generar secuencias señal mutantes es la generación de un "banco codónico" al comienzo de una secuencia codificante que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal (es decir, los cambios son silenciosos). Esto puede conseguirse cambiando la tercera posición nucleotídica de cada codón; Adicionalmente, algunos aminoácidos, tales como leucina, serina y arginina, tiene múltiples primera y segunda posiciones que pueden añadir complejidad en la elaboración del banco. Este método de mutagénesis se describe en detalle en Yansura *et al.* (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón del mismo. Este conjunto limitado proporciona una comparación de niveles de expresión de cada cadena así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados en diversas combinaciones de fuerza de TIR. Las fuerzas de TIR pueden determinarse cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador como se describe en detalle en Simmons *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.840.523. Basándose en la comparación de fuerza traduccional, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinar en las construcciones del vector de expresión de la invención.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), Bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacterias, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gram negativas. En una realización, se usan células de *E. coli* como hospedadores para la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Depósito de ATCC Nº 27.325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 Δ fluA (Δ tonA) ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT(Δ nmpc-fepE) degP41 kan^R (Patente de Estados Unidos Nº 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31.608) también son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen, por ejemplo, en Bass *et al.*, Proteins, 8: 309-314 (1990). Es necesario generalmente seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la capacidad de replicación del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, *E. coli*, *Serratia* o por especies de *Salmonella* pueden usarse convenientemente como el hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para proporcionar el replicón. normalmente la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y pueden incorporarse convenientemente inhibidores de proteasa adicionales en el cultivo celular.

Producción de anticuerpos

Se transforman células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota de modo que el ADN sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que emplea cloruro cálcico se usa en general para células bacterianas que contienen barreras de pared celular sustanciosas. Otro método para transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más usada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de cultivo luria (LB) más complementos nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contienen un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para cultivo de células que expresan el gen resistente a ampicilina.

También puede incluirse cualquier complemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico a concentraciones apropiadas introducidas solas o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioueritriol y ditiotreitrol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el cultivo de *E. coli*, por ejemplo, el crecimiento se produce a un intervalo de temperaturas incluyendo, pero sin limitación, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C y a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo

principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH puede ser de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4 o de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión proteica se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, se usan promotores de PhoA para controlar la transcripción de los polipéptidos. En consecuencia, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para inducción. En una realización, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons *et al.*, J. Immunol. Methods (2002), 263: 133-147). Pueden usarse otros diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan a y se recuperan del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica alterar el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que se han roto las células, los residuos celulares o las células completas pueden retirarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía de resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse al medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células pueden retirarse de cultivo y producirse sobrenadante de cultivo que se filtra y se concentra para mayor purificación de las proteínas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse usando métodos conocidos habitualmente tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia de Western.

En un aspecto de la invención, se realiza producción de anticuerpos en gran cantidad por un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación semicontinua a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, por ejemplo de aproximadamente 1000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan turbinas agitadoras para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa (una fuente de carbono/energía habitual). La fermentación a pequeña escala se refiere en general a fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión proteica se inicia normalmente después de haberse cultivado las células en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO₅₅₀ de aproximadamente 180-220, estado en el cual las células están en la fase estacionaria temprana. Pueden usarse diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de su inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque pueden usarse tiempos de inducción más largos o más cortos.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpos secretados, pueden usarse vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis, trans-isomerasa con actividad chaperona) para co-transformar las células procariontes hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen *et al.* (1999) J Bio Chem 274: 19601-19605; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.083.715; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17106-17113; Arie *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 39: 199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente las que son proteolíticamente sensibles), pueden usarse ciertas cepas hospedadoras deficientes con respecto a enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, pueden modificarse cepas de células hospedadoras para efectuar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly *et al.* (1998), mencionado anteriormente; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.264.365; Georgiou *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.508.192; Hara *et al.*, Microbial Drug Resistance, 2: 63-72 (1996).

En una realización, se usan cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas como células hospedadoras en el sistema expresión de la invención.

Purificación de anticuerpos

En una realización, la proteína de anticuerpo producido en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homólogas para ensayos y usos adicionales. Pueden emplearse métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son

ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamientos en columnas de inmutafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofenofe, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

En un aspecto, se usa Proteína A inmovilizada en una fase sólida para purificación por inmutafinidad de los productos de anticuerpo de la invención. La Proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad con la región Fc de anticuerpos. Lindmark *et al* (1983) J. Immunol. Meth. 62: 1-13. La fase sólida en la que se inmoviliza la Proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se recubre con un reactivo, tal como glicerol, para evitar posiblemente la adherencia no específica de contaminantes.

Como la primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente puede aplicarse a una fase sólida con Proteína A inmovilizada para permitir la unión específica del anticuerpo de interés con Proteína A. La fase sólida se lavaría después para retirar contaminantes unidos de forma no específica con la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución.

Generación de anticuerpos usando células hospedadoras eucariotas.

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(a) Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada generalmente es una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. En la expresión de células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero así como líderes secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

El ADN para dicha región precursora se liga en fase de lectura con ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

En general, no es necesario un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente solamente porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, cuando sea relevante, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y de este modo sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína-I y II (por ejemplo, genes de metalotioneína de primate), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR pueden identificarse en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Las células hospedadoras apropiadas cuando se emplea DHFR de tipo silvestre incluyen, por ejemplo, la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente hospedadores de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR de tipo silvestre, u otro marcador seleccionable tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden

seleccionarse por cultivo celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase Patente de Estados Unidos N° 4.965.199.

5 (iv) Componente del promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y está unido operativamente con ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia hallada 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptidos de anticuerpo de vectores en células hospedadoras de mamífero puede controlarse, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se desvela un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como un vector en la Patente de Estados Unidos N° 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, Nature 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de interferón- β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, pueden usarse repeticiones terminales largas del virus del Sarcoma de Rous como el promotor.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica un polipéptido de anticuerpo de la invención por eucariotas superiores puede aumentarse con frecuencia insertando una secuencia potenciadora en el vector. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. Este potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido de anticuerpo, pero se localiza en general en un sitio 5' del promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente, 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

(vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, incluyendo células hospedadoras de vertebrados. La preparación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma del cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL

34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N. Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para producción de anticuerpos y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma) Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), (Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, puede usarse cualquiera de los medios descritos en Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes de Estados Unidos N° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de Estados Unidos Re. 30.985 como un medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tal como adenosina y timidina), antibióticos (tales como fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que se conocerán por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

(ix) Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse de forma intracelular, o secretarse directamente al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los residuos en partículas, bien células hospedadoras o bien fragmentos lisados, se retiran en general, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran en general primero usando un filtro de concentración de proteína disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica de purificación generalmente aceptable. La idoneidad de los reactivos de afinidad tales como proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). La matriz con la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para purificación. Otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se recupere.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a etapas de purificación adicionales, según sea necesario, por ejemplo por cromatografía de interacción hidrófoba de pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizado en general a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, sal de aproximadamente 0-0,25 M).

Debería observarse que, en general, las técnicas y metodologías para preparar anticuerpos para uso en investigación, ensayo y uso clínico están bien establecidas en la técnica, de forma coherente con lo anterior y/o según se considere apropiado por un experto en la materia para el anticuerpo de interés particular.

Ensayos de actividad

Los anticuerpos de la invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos incluyendo, pero sin limitación, secuenciación N terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño no desnaturalizante (HPLC), espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

Cuando sea necesario, los anticuerpos se analizan con respecto a su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se ensayan con respecto a su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

En una realización, la invención contempla un anticuerpo alterado que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, que lo hacen un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. En ciertas realizaciones, las actividades de Fc del anticuerpo se miden para asegurar que se mantengan solamente las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión del receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión con Fc γ R (careciendo por tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan solamente Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos Citolíticos Naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95: 652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión de C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por tanto carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996). También puede realizarse unión de FcRn y determinaciones de eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

Fragmentos de anticuerpo

La presente invención abarca fragmentos de anticuerpo. En ciertas circunstancias hay ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida, y puede conducir a mejor acceso a tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv pueden todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo de este modo la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpo analizadas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH puede recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con mayor semivida *in vivo* que comprenden restos de epítopos de unión a receptor de recuperación en la Patente de Estados Unidos Nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Patente de Estados Unidos Nº 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión de sFv para producir fusión de una proteína efectora en el extremo carboxilo o el amino terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering ed. Borrebaeck, mencionado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no sea humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo con secuencias de región hipervariable las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado método de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que está más cerca de la del roedor se acepta entonces como el marco conservado humano para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901). Otro método usa un marco conservado particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco conservado puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285; Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623).

Es en general además deseable que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, de acuerdo con un método, se preparan anticuerpos humanizados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están disponibles habitualmente modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la materia están familiarizados con ellos. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias receptora e importada de modo que se consigue la característica del anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de región hipervariable están implicados directamente y más sustancialmente en la influencia sobre la unión a antígeno.

Anticuerpos humanos

Pueden construirse anticuerpos anti-poliubiquitina humanos de la invención combinando una secuencia o secuencias de dominio variable del clon Fv seleccionadas de bibliotecas de presentación de fagos derivadas de seres humanos con una secuencia o secuencias de dominio constante humano conocidas como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos anti-poliubiquitina monoclonales humanos de la invención por el método de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, en Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógena. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

También puede usarse redistribución de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impronta epitópica", bien la región variable de cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación de fagos como se ha descrito anteriormente se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana

en el que la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fago primario, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero de cadena humana. Cuando el proceso se repite para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para poliubiquitina incluyendo un enlace de lisina específico y el otro es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse con dos poliubiquitinas diferentes que tienen dos enlaces de lisina diferentes. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda, y los rendimientos de productos son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655 (1991).

De acuerdo con una realización diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión, por ejemplo, es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. En ciertas realizaciones, la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera, está presente en al menos una de las fusiones. Los ADNc que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina se insertan en vectores de expresión separados, y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales dé como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de importancia particular.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Se ha descubierto que esa estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solamente una mitad de la molécula biespecífica posibilita un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes con menores (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina, el otro con biotina. Dichos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para tratamiento de infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Se conocen bien en la técnica agentes de entrecruzamiento adecuados, y se desvelan en la Patente Estados Unidos N°

4.676.980, junto con varias técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985) describe un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar anticuerpos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejo con ditiol arsenita sódica para estabilizar ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte después al Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Progresos recientes han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) describe la producción de una molécula de $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo fue capaz de unirse con células que sobreexpresaban el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron con las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se obliga a los dominios VH y VL de un fragmento a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha indicado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos por el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* J. Immunol. 147: 60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno con el que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización comprende (o consiste en), por ejemplo, una región Fc o una región bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino-terminales de la región Fe. En una realización, un anticuerpo multivalente comprende (o consiste en), por ejemplo, de tres a aproximadamente ocho, o cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (por ejemplo, dos cadenas polipeptídicas), en la que la cadena o las cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender: cadena de región VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-Fc; o cadena de región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender además al menos dos (por ejemplo, cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en el presente documento puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en el presente documento comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

Variantes de anticuerpo

En algunas realizaciones, se contemplan una modificación o modificaciones de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u

otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico de anticuerpo o por síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen por ejemplo, delecciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede realizarse cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos de anticuerpo objeto en el momento en el que se realice esa secuencia.

Un método útil para identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. En el presente documento, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan después introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que esté predeterminada la naturaleza de la mutación en sí misma. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza exploración de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o la región diana y las inmunoglobulinas expresadas se exploran con respecto a la actividad deseada.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencias de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con el extremo N o C terminal del anticuerpo con una enzima (por ejemplo para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla A bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla A, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y explorarse los productos.

TABLA A

Resto Original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pp. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativos o en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Un modo conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica maduración de afinidad usando presentación de fagos. Brevemente, varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada sitio. Los anticuerpos generados de este modo se presentan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de cubierta del fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetada dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se exploran después con respecto a su actividad biológica (por ejemplo afinidad de unión) como se desvela en el presente documento. Para identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, puede realizarse mutagénesis por exploración (por ejemplo, exploración de alanina) para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión con antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para sustitución de acuerdo con técnicas conocidas en este campo, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez que se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración usando técnicas conocidas en este campo, incluyendo las descritas en el presente documento, y pueden seleccionarse anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

Se preparan moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo por diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis por PCR y mutagénesis por casetes de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácidos (por ejemplo una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína bisagra.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo silvestre, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos conservarían no obstante sustancialmente las mismas características requeridas para utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo silvestre. Por ejemplo, se cree que pueden realizarse ciertas alteraciones en la región Fc que darían como resultado unión de C1q alterada (es decir, mejorada o reducida) y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322: 738-40 (1988); Patente de Estados Unidos N° 5.648.260; Patente de Estados Unidos N° 5.624.821; y documento WO94/29351 con respecto a

otros ejemplos de variantes de región Fc.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden modificaciones en la interfaz de polipéptidos Fc que comprenden la región Fc, en los que las modificaciones facilitan y/o promueven la heterodimerización. Estas modificaciones comprenden la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido Fc y una cavidad en un segundo polipéptido Fc, en el que la protuberancia se puede situar en la cavidad para promover la formación de complejos del primer y segundo polipéptidos de Fc. Se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos con estas modificaciones, por ejemplo, como se describe en la Patente Estados Unidos Nº 5.731.168.

10 *Inmunconjugados*

En otro aspecto, la divulgación proporciona inmunconjugados, o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19: 605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; Patente de Estados Unidos 4.975.278) permite el suministro dirigido del resto farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en el que la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para células normales así como las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* pp. (15 mar 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506). Se busca de este modo la máxima eficacia con mínima toxicidad. Se ha indicado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 183-87). Los fármacos usados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) mencionado anteriormente). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler *et al* (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler *et al* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028; Mandler *et al* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al* (1998) *Cancer Res.* 58: 2928; Hinman *et al* (1993) *Cancer Res.* 53: 3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluye la unión de tubulina, unión de ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a estar inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos del receptor de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopos ¹¹¹In o ⁹⁰Y unido con un enlazador de tiourea-quelante (Wiseman *et al* (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7): 766-77; Wiseman *et al* (2002) *Blood* 99(12): 4336-42; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10): 2453-63; Witzig *et al* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15): 3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no de Hodgkin de linfocitos B (NHL), la limitación de como resultado citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado farmacológico de anticuerpo compuesto de un anticuerpo hu CD33 unido con caliqueamicina, se aprobó en el 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda por inyección (*Drugs of the Future* (2000) 25(7): 686; Patentes de Estados Unidos Nº 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado farmacológico de anticuerpo compuesto del anticuerpo huC242 unido mediante el enlazador de disulfuro SPP con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, se ensaya con respecto al tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado farmacológico de anticuerpo compuesto del anticuerpo monoclonal anti-antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) unido con el resto farmacológico maitansinoide, DM1, se ensaya con respecto al tratamiento potencial de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico de CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina *et al* (2003) *Nature Biotechnology* 21(7): 778-784) y están en desarrollo terapéutico.

Se han descrito en el presente documento (anteriormente) agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, genolina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 octubre de 1993. Están disponibles diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de

acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(*p*-azidobenzoyl) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase, documento WO94/11026.

También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de moléculas pequeñas, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolostatinas, aurostatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto africano oriental *Maytenus serrata* (Patente de Estados Unidos Nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y C-3 maitansinol ésteres (Patente de Estados Unidos Nº 4.151.042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608. 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533.

Los restos farmacológicos maitansinoides son restos farmacológicos atractivos en conjugados de fármacos de anticuerpo porque son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para conjugación mediante los enlazadores no de disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra diversas líneas celulares tumorales.

Las realizaciones ejemplares de restos farmacológicos maitansinoides incluyen: DM1; DM3 y DM4. Se desvelan inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos para prepararlos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.208.020, 5.416.064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describió inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado DM1 unido con el anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se describió que el conjugado era altamente citotóxico para células de cáncer de colon cultivadas, y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992) describe inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide mediante un enlazador disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se unía con el antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une con el oncogén HER-2/ncu. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado farmacológico consiguió un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas maitansinoides por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7- maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide por enlace químico de un anticuerpo con una molécula maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020. Una media de 3-4 moléculas maitansinoides conjugadas por molécula de anticuerpo ha mostrado eficacia en la potenciación de la citotoxicidad de células diana sin afectar de forma negativa a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo potenciara la citotoxicidad frente al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides se conocen bien en la técnica y pueden sintetizarse por técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se desvelan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente indicadas anteriormente en el presente documento. Los maitansinoides incluyen, pero sin limitación, maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático u otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para preparar conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los desvelados en la Patente de Estados Unidos Nº 5.208.020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992), y Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Pueden prepararse conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles

por ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles por peptidasa o grupos lábiles por esterasa, como se ha desvelado en las patentes anteriormente identificadas. Se describen y ejemplifican en el presente documento grupos de enlaces adicionales.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y maitansinoide usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiotano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento incluyen, pero sin limitación, *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)) y *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

El enlazador puede unirse con la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo del enlace. Por ejemplo, puede formarse un enlace éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroxilometilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Auristatinas y dolostatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolostatina, las auristatinas (Patente de Estados Unidos Nº 5635483; 5780588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento U.S. 5663149) y actividad antifúngica (Pettit *et al* (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2961-2965). El resto farmacológico de dolostatina o auristatina puede unirse con el anticuerpo mediante el extremo N (amino) terminal o el extremo C (carboxilo) terminal del resto farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen los restos farmacológicos de monometilauristatina con enlace N terminal DE y DF, desvelados en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", U.S. Ser. Nº 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen MMAE y MMAF. Las realizaciones ejemplares adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores (descritos adicionalmente en el presente documento) incluyen Ab-MC-vc-PAB-MMAF, Ab-MC-vc-PAB-MMAE, Ab-MC-MMAE y Ab-MC-MMAF.

Normalmente, pueden prepararse restos farmacológicos basados en péptidos formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis de fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que se conocen bien en el campo de la química peptídica. Los restos farmacológicos de auristatina/dolostatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos de: documentos U.S. 5.635.483; U.S. 5.780.588; Pettit *et al* (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit *et al* (1998) Anti-Cancer Drug Design 13: 243-277; Pettit, G.R., *et al.* Synthesis, 1996, 719-725; y Pettit *et al* (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863. Véase también Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", U.S. Ser. Nº 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, enlazadores y métodos para preparar compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con enlazadores).

Caliqueamicina

En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN bicatenarias a concentraciones sub-picomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase Patentes de Estados Unidos Nº 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Los análogos estructurales de caliqueamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , *N*-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las Patentes de Estados Unidos anteriormente mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante la internacionalización mediada por anticuerpo potencia en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos N° 5.053.394, 5.770.710, así como esperamicinas (Patente de Estados Unidos 5.877.296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, documento WO 93/21232 publicado el 28 octubre de 1993.

La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Está disponible diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de espín para captura de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcadores u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis de aminoácidos química usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcadores tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} mediante un resto de cisteína en el péptido. Puede unirse Itrio-90 mediante un resto de lisina. Puede usarse el método de IODOGEN (Fraker *et al* (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando diversos agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como *N*-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(*N*-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(*p*-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietil triaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase, documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" lo que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácido, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente de Estados Unidos N° 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con reactivos de reticulación: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos). Véase páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados farmacológicos de anticuerpo

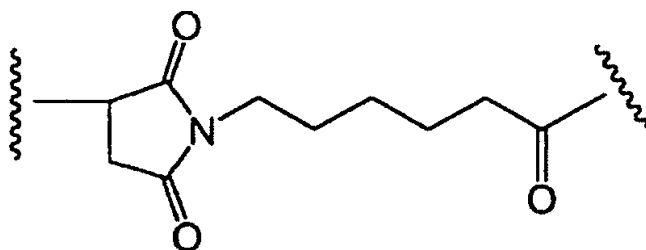
En los conjugados farmacológicos de anticuerpo (ADC) descritos, un anticuerpo (Ab) se conjuga con uno o más restos farmacológicos (D), por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos farmacológicos por anticuerpo, mediante un enlazador (L). El ADC de Fórmula I puede prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por los expertos en la materia incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de enlazador bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar ADC.

Ab-(L-D)_n I

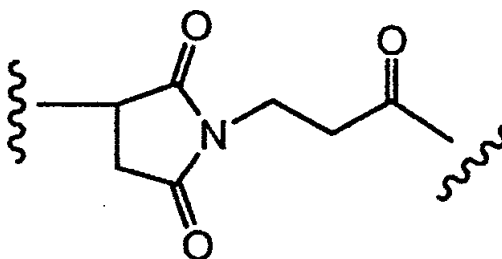
El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), *N*-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), *N*-Succinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC") y *N*-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", U.S. Ser. N° 10/983.340, presentado el 5 de noviembre de 2004.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes enlazadores de aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprenden un componente enlazador de aminoácidos incluyen los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos de origen no natural, tales como citrulina. Los componentes de enlazadores de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

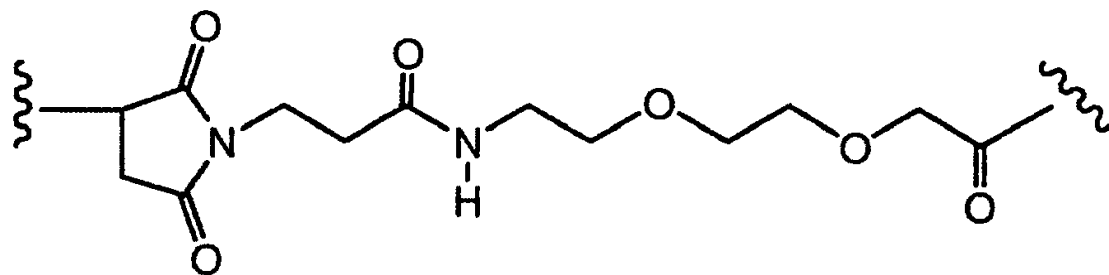
Se muestran a continuación estructuras de componentes enlazadores ejemplares (en las que la línea ondulada indica sitios de unión covalente con otros componentes del ADC):



MC

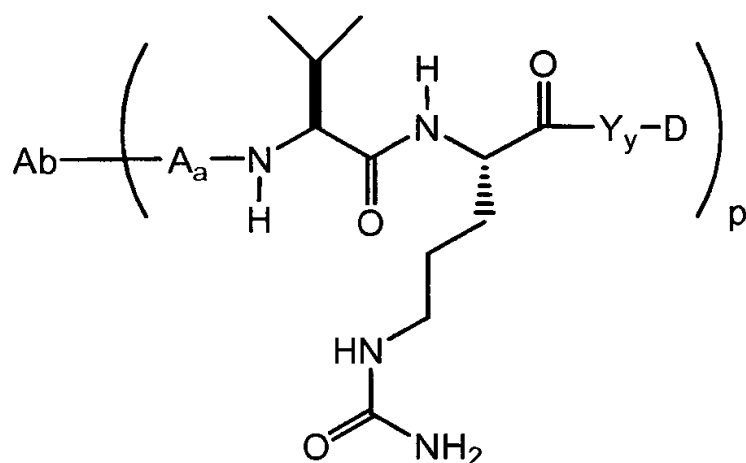


MP

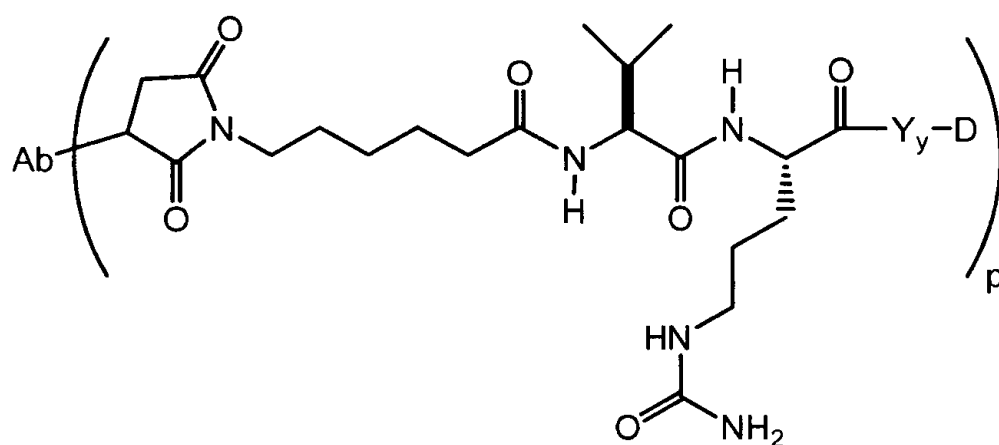


MPEG

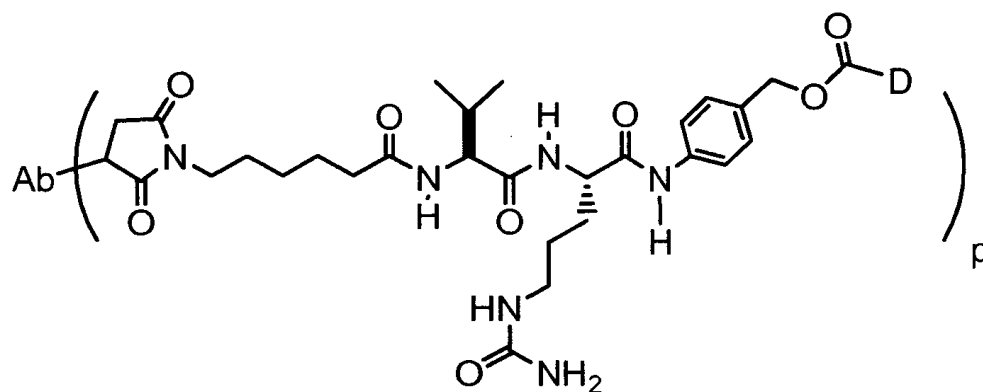
Los componentes enlazadores ejemplares adicionales y abreviaturas incluyen (en el que el anticuerpo (Ab) y enlazador se representan, y p es de 1 a aproximadamente 8):



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

5

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcares en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como NHS ésteres, HOBt ésteres, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos de maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, enlaces de cisteína. Los anticuerpos suelen hacerse reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Cada enlace de cisteína formará por lo tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivo. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Pueden introducirse grupos de tiol reactivos en el anticuerpo (o fragmento del mismo) introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácidos de cisteína no nativos).

20

También pueden producirse conjugados farmacológicos de anticuerpo de la invención mediante modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo o fármaco enlazador. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidativos de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amino de reactivos enlazadores o restos farmacológicos. Los grupos básicos de Schiff de imina resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbolino (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3: 138-146; documento U.S. 5362852). Dicho aldehído puede hacerse reaccionar con un resto farmacológico o nucleófilo enlazador.

De forma similar, los grupos nucleófilos en un resto farmacológico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como NHS ésteres, HOBt ésteres, haloformatos y haluros ácidos; (ii) alquil y bencil haluros tales como haloacetamidas; (iii) grupos de aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

Como alternativa, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud de ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado bien adyacentes entre sí o bien separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en pre-dirección tumoral en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de retirada de conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación y después administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Puede prepararse anticuerpo (Ab)-MC-MMAE mediante conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento MC-MMAE de la siguiente manera. El anticuerpo, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotretol 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se cambia por elución sobre resina de Sephadex G25 y se eluye con PBS con DPTA 1 mM. El valor de tiol/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducida de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo. El reactivo enlazador farmacológico, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado 2H9 en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para detener la reacción y proteger cualquier grupo tiol de anticuerpo que no ha reaccionado. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración de centrifuga y se purifica 2H9-MC-MMAE y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congela para almacenamiento.

Puede prepararse anticuerpo-MC-MMAF mediante conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionado en el presente documento con MC-MMAF siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

Se prepara anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAE por conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento con MC-val-cit-PAB-MMAE siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

Se prepara anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAF por conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento con MC-val-cit-PAB-MMAF siguiendo el protocolo proporcionado para la preparación de Ab-MC-MMAE.

Se prepara anticuerpo-SMMC-DM1 por conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento con SMCC-DM1 de la siguiente manera. Se derivatiza anticuerpo purificado con (Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el enlazador de SMCC. Específicamente, el anticuerpo se trata a 20 mg/ml en fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5 con 7,5 equivalentes molares de SMMC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de agitar durante 2 horas con argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo se agrupan y se ensayan.

El anticuerpo-SMCC preparado de esta manera se diluyen con fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una solución 10 mM de DM1 en dimetilacetamida. La reacción se agita a temperatura ambiente con argón durante 16,5 horas. La mezcla de reacción de conjugación se filtra a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con PBS 1 x a pH 6,5. La relación de fármaco DM1 y anticuerpo (p) puede ser de aproximadamente 2 a 5, como se mide por la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

Ab-SPP-DM1 se prepara por conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento con SPP-DM1 de la siguiente manera. El anticuerpo purificado se derivatiza con *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato para introducir grupos de ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trata con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de incubación durante 90 minutos con argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con un tampón de citrato sódico 35 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM. Las fracciones que contenían anticuerpos se agruparon y se ensayaron. El grado de modificación del anticuerpo se determina como se ha descrito anteriormente.

Se diluye anticuerpo anticuerpo-SPP-Py (aproximadamente 10 μ moles de grupos de 2-tiopiridina liberables) con el tampón de citrato sódico 35 mM anterior, pH 6,5 hasta una concentración final de aproximadamente 2,5 mg/ml. Después se añade DM1 (1,7 equivalentes, 17 μ moles) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, 3 % v/v en la mezcla de reacción final) a la solución de anticuerpo. La reacción sucede a temperatura ambiente con argón durante aproximadamente 20 horas. La reacción se carga en una columna de filtración en gel de Sephacryl S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato sódico 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El caudal puede ser de aproximadamente 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml de cada una). El número de moléculas farmacológicas DM1 unidas por molécula de anticuerpo (p') se determina midiendo la absorbancia a 252 nm y 280 nm, y puede ser de aproximadamente 2 a 4 restos de fármaco DM1 por anticuerpo 2H9.

Se prepara anticuerpo-BMPEO-DM1 por conjugación de cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento con BMPEO-DM1 de la siguiente manera. El anticuerpo se modifica por el reactivo bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido que no ha reaccionado en la superficie del anticuerpo. Esto puede conseguirse disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla de etanol/agua al 50 % hasta una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar diez veces a una solución que contiene anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y permitiendo que reaccione durante 1 hora para formar un intermedio enlazador de anticuerpo, 2H9-BMPEO. El BM(PEO)4 en exceso se retira por filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en citrato 30 mM, pH 6 con tampón de NaCl 150 mM. Se disuelve un exceso molar aproximadamente 10 veces de DM1 en dimetil acetamida (DMA) y se añade al intermedio de 2H9-BMPEO. También puede emplearse dimetil formamida (DMF) para disolver el reactivo del resto farmacológico. Se permite que la mezcla de reacción reaccione durante una noche antes de la filtración en gel o diálisis en PBS para retirar DM1 que no ha reaccionado. Se usa filtración en gel en columnas S200 en PBS para retirar agregados de alto peso molecular y para proporcionar 2H9-BMPEO-DM1 purificado.

Derivados de Anticuerpos

Los anticuerpos pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. En una realización, los restos adecuados para derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o bien copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(*n*-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se usa más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el anticuerpo derivado se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteico que pueden calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005)). La radiación puede ser de cualquier longitud onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico hasta una temperatura a la que se destruyen células próximas al resto no proteico de anticuerpo.

Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención para almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas u otras secas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, incluyendo, pero sin limitación, las que tienen actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes convenientemente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli(metil-metacilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsula) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones para usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la inmunoglobulina de la invención, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etilen-vinil acetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando permanecen inmunoglobulinas encapsuladas en el cuerpo durante largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden preverse estrategias racionales para estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede conseguirse estabilización modificando los restos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Usos

Un anticuerpo de la invención puede usarse, por ejemplo, en métodos terapéuticos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los anticuerpos de la invención pueden usarse como un antagonista para bloquear parcial o completamente la actividad antigénica específica *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo*. Además, al menos algunos de los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la actividad antigénica de otras especies. En consecuencia, los anticuerpos de la invención pueden usarse para inhibir una actividad antigénica específica, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos de un mamífero que tienen el antígeno con el que reacciona de forma cruzada un anticuerpo de la invención (por ejemplo, chimpancés, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, un anticuerpo de la invención puede usarse para inhibir actividades antigénicas poniendo en contacto el anticuerpo con el antígeno de modo que se inhiba la actividad antigénica. En una realización, el antígeno es una molécula proteica humana.

En una realización, un anticuerpo de la invención puede usarse en un método para inhibir un antígeno en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad antigénica es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un

anticuerpo de la invención de modo que se inhiba la actividad antigénica en el sujeto. En una realización, el antígeno es una molécula proteica humana y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo de la invención. Además el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, por administración del antígeno o expresión de un transgén antigénico). Un anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, un anticuerpo de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que reacciona de forma cruzada el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayos de dosificaciones y ciclos temporales de administración). Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retardar el progreso de, prevenir/retardar la reaparición de, aliviar o prevenir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con expresión y/o actividad anómala del poliubiquitinas y proteínas poliubiquitinadas, incluyendo pero sin limitación cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la ruta de ubiquitina, trastornos inmunitarios/inflamatorios, trastornos neurológicos y otros trastornos relacionados con la ruta de ubiquitina.

En un aspecto, un anticuerpo de bloqueo de la invención es específico para una poliubiquitina que tiene un enlace de lisina particular, e inhibe la actividad de poliubiquitina normal bloqueando o interfiriendo con la interacción entre una poliubiquitina que tiene un enlace de lisina particular y una proteína que interacciona con esa poliubiquitina, inhibiendo de este modo la ruta de señal correspondiente y otros acontecimientos moleculares o celulares asociados.

En ciertas realizaciones, un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico se administra al paciente. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno con el que se une se internalizan por la célula, dando como resultado eficacia terapéutica aumentada del inmunoconjugado en la destrucción de la célula diana con la que se une. En una realización, el agente citotóxico se dirige a o interfiere con ácido nucleico en la célula diana. Los ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos indicados en el presente documento (tales como un maitansinoide o una caliqueamicina), un isótopo radiactivo o una ribonucleasa o una ADN endonucleasa.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otras composiciones en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede co-administrarse con otro anticuerpo y/o agentes adyuvantes/terapéuticos (por ejemplo, esteroides). Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede combinarse con un antiinflamatorio y/o antiséptico en un esquema de tratamiento, por ejemplo al tratar cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, incluyendo cáncer, trastornos musculares, trastornos genéticos relacionados con la ruta de ubiquitina, trastornos inmunitarios/inflamatorios, trastornos neurológicos y otros trastornos relacionados con la ruta de ubiquitina. Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (cuando se incluyen los dos o más agentes en la misma formulación o formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de y/o después de la administración de la terapia o las terapias adyuvantes.

Un anticuerpo de la invención (y agente terapéutico adyuvante) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local, intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra convenientemente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo por inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

La localización de la diana de unión de un anticuerpo de la invención puede tenerse en cuenta en la preparación y administración del anticuerpo. Cuando la diana de unión es una molécula intracelular, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se introduzca en la célula en la que se localiza la diana de unión. En una realización, un anticuerpo de la invención puede expresarse intracelularmente como un intracuerpo. El término "intracuerpo" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se expresa intracelularmente y que es capaz de unirse selectivamente a una molécula diana, como se describe en Marasco, *Gene Therapy* 4: 11-15 (1997); Kontermann, *Methods* 34: 163-170 (2004); Patente de Estados Unidos N°. 6.004.940 y 6.329.173; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0104402, y Publicación de PCT N° WO2003/077945. Se efectúa expresión intracelular de un intracuerpo introduciendo un ácido nucleico que codifica el anticuerpo deseado o parte de unión a antígeno del mismo (que carece de la secuencia líder de tipo silvestre y señales secretoras normalmente asociadas con el gen que codifica ese anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) en una célula diana. Puede usarse cualquier método convencional para introducir ácidos nucleicos en una célula, incluyendo, pero sin limitación, microinyección, inyección balística, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, liposomas y transfección con vectores retrovirales, adenovirales, virales adenoasociados y vaccinia que portan el ácido nucleico de interés. Uno o más ácidos nucleicos que codifican todo o una parte de un anticuerpo anti-poliubiquitina de la invención puede suministrarse a una célula diana de modo que se expresen uno o más intracuerpos que tengan capacidad de unión intracelular con una poliubiquitina y modulación de una o más rutas celulares mediadas por poliubiquitina.

En otra realización, se proporcionan anticuerpos de internalización. Los anticuerpos pueden poseer ciertas características que potencian el suministro de anticuerpos a células, o pueden modificarse para que posean dichas características. Las técnicas para conseguirlo se conocen en este campo. Por ejemplo, se sabe que la cationización de un anticuerpo facilita su captación en células (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 6.703.019).

5 También pueden usarse lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo a células. Cuando se usen fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente con el dominio de unión de la proteína diana es generalmente ventajoso. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conservan la capacidad para unirse con la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse por tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

10 La entrada de polipéptidos moduladores en células diana puede potenciarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, ciertas secuencias, tales como las derivadas de Tat del VIH o la proteína de homeodominio Antennapedia son capaces de dirigir la captación eficaz de proteínas heterólogas entre membranas celulares. Véase, por ejemplo, Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999), 96: 4325-4329.

15 Cuando la diana de unión se localiza en el cerebro, ciertas realizaciones de la invención posibilitan que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo atraviese la barrera hematoencefálica. Ciertas enfermedades neurodegenerativas se asocian con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, de modo que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede introducirse fácilmente en el cerebro. Cuando la barrera hematoencefálica permanece intacta, existen varios enfoques conocidos en la técnica para transportar moléculas a través de ella, incluyendo, pero sin limitación, métodos físicos, métodos basados en lípidos y métodos basados en receptores y canales.

20 Los métodos físicos para transportar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, evitar la barrera hematoencefálica completamente, o crear aperturas en la barrera hematoencefálica. Los métodos de evitación incluyen, pero sin limitación, inyección directa en el cerebro (véase, por ejemplo, Papanastassiou *et al.*, Gene Therapy 9: 398-406 (2002)), suministro potenciado por convección/infusión intersticial (véase, por ejemplo, Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)), e implantación de un dispositivo de suministro en el cerebro (véase, por ejemplo, Gill *et al.*, Nature Med. 9: 589-595 (2003); y Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Los métodos para crear aperturas en la barrera incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos 2002/0038086), presión osmótica (por ejemplo, por administración de manitol hipertónico (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 y 2, Plenum Press, N.Y. (1989))), permeabilización, por ejemplo, por bradiquinina o permeabilizador A-7 (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 5.112.596, 5.268.164, 5.506.206 y 5.686.416), y transfección de neuronas que están a ambos lados de la barrera hematoencefálica con vectores que contienen genes que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2003/0083299).

40 Los métodos basados en lípidos para transportar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, encapsular el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en liposomas que se acoplan a fragmentos de unión a anticuerpo que se unen con receptores en el endotelio vascular de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20020025313), y recubrir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con partículas lipoproteicas de baja densidad (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20040204354) o apolipoproteína E (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 20040131692).

50 Los métodos basados en receptores y canales para transportar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a través de la barrera hematoencefálica incluyen, pero sin limitación, el uso de bloqueadores de glucocorticoides para aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2002/0065259, 2003/0162695 y 2005/0124533); activación de canales de potasio (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2005/0089473), inhibición de los transportadores de fármacos ABC (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2003/0073713); recubrimiento de anticuerpos con una transferrina y modulación de la actividad del o los receptores de transferrina (véase, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2003/0129186), y la cationización de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.004.697).

60 La composición de anticuerpo de la invención se formularía, dosificaría y administraría de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. No es necesario pero el anticuerpo se formula opcionalmente con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpos de la invención presentes en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en el presente documento, o de aproximadamente 1 a 99 % de las

dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine empírica/clínicamente que sea apropiada.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, por ejemplo, bien por una o más administraciones separadas, o bien por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría en general hasta que se produjera una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, puede administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo cada semana o cada tres semanas (por ejemplo de modo que el paciente reciba de aproximadamente dos a aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguida de una o más dosis menores. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Artículos de fabricación

Como se describe en el presente documento, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí sola o cuando se combina con otra composición eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tampón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-POLIUBIQUITINA DE PRIMERA GENERACIÓN

A) Clasificación de Bibliotecas

Se someten fagos de bibliotecas de anticuerpo sin tratamiento previo a selección de unión frente a péptidos sintéticos inmovilizados incluyendo un enlace isopeptídico que imita bien la poliubiquitina con enlaces K49 o bien la poliubiquitina con enlaces K63. No se observó enriquecimiento después de seis ciclos de selección. Los péptidos sintéticos se alargaron, y las bibliotecas de anticuerpos sin tratamiento previo se exploraron de nuevo. Una vez más, no se observó enriquecimiento después de seis ciclos de selección de unión.

Se sometieron fagos de la biblioteca de anticuerpos YS-B sin tratamiento previo a cuatro ciclos de selección de unión frente a cadenas de poliubiquitina que tenían diferentes enlaces isopeptídicos de ubiquitina conocidos. La biblioteca de anticuerpos YS-B contiene aminoácidos aleatorios en las tres CDR de cadena pesada y CDR3 de

cadena ligera (véase Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2005-0106667), y se basa en el anticuerpo humanizado 4D5.

Se inmovilizaron cadenas de poliubiquitina con enlaces K48 o enlaces K63 de longitud completa sintetizadas enzimáticamente de 3 a 7 unidades de longitud (Boston Biochem) en inmunoplasmas Maxisorp de 96 pocillos (NUNC). Las placas se recubrieron durante una noche con 5 µg/ml de poliubiquitina con enlaces K48 o K63 en tampón de carbonato 50 mM pH 9,6. Las placas recubiertas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) o caseína, a una concentración de 0,2 % en PBS. Las placas se lavaron posteriormente con PBS que contenía Tween 20 0,05 % en (PBST) a 25 °C. Cada pocillo se incubó con 100 µl de 10¹² fagos/ml en tampón de clasificación (BSA o caseína, 0,2 % en PBST) durante 2 horas a temperatura ambiente. Cada pocillo se lavó ocho veces en PBST para retirar los fagos no unidos. Los fagos unidos se eluyeron por incubación con HCl 0,1 M durante 10 minutos, y el eluyente se neutralizó con base Tris 2 M. El fago eluido se propagó en *Escherichia coli* XL1-blue (Stratagene) con la adición de fago auxiliar M13-K07 (New England Biolabs).

Se usaron fagos amplificados para ciclos adicionales de selección frente a la misma diana que se usó en el ciclo previo. Para los ciclos de selección de dos a cuatro, se incluyó ubiquitina 10 µg/ml en el tampón de clasificación como una contraselección. Los ciclos tres y cuatro también se clasificaron tanto con como sin contraselección adicional: bien poliubiquitina con enlaces K63 10 µg/ml en la selección de poliubiquitina con enlaces K48 o bien poliubiquitina con enlaces K48 10 µg/ml en la selección de poliubiquitina con enlaces K63.

Para los clones en los que los ciclos de selección dos a cuatro carecían de contraselección de poliubiquitina, se cultivaron clones individuales en un formato de 96 pocillos en 400 µl de caldo de cultivo 2YT complementado con carbenicilina y fago auxiliar M13-K07. Los sobrenadantes de esos cultivos se usaron en ELISA de fagos de alto rendimiento para explorar clones con respecto a la unión con poliubiquitina con enlaces K48, poliubiquitina con enlaces K63, ubiquitina y BSA. Todos los clones se sometieron a análisis de secuencia de ADN. Una parte de la cadena pesada que incluye la HVR se secuenció, permitiendo el análisis de las regiones hipervariables de cadena pesada. Las regiones hipervariables de cadena pesada para los clones que reconocían la poliubiquitina con enlaces K48 o poliubiquitina tanto con enlaces K48 como con enlaces K63 se muestran en las Figuras 2A-C. Las regiones hipervariables de cadena pesada para los clones que reconocían poliubiquitina con enlaces K63 o poliubiquitina tanto con enlaces K48 como con enlaces K63 se muestran en las Figuras 3A y 3B. La HVR de cadena ligera para cada clon no se secuenció, pero basándose en la naturaleza de la biblioteca de YS-B, se esperaba que las secuencias de HVR-L1 y HVR-L2 fueran invariantes, mientras que se esperaba que la secuencia de HVR-L3 fuera específica de clon. La secuencia de HVR-L1 es RASQSVSSAVA (SEC ID N°: 79) y la secuencia de HVR-L2 es SASSLYS (SEC ID N°: 80), de acuerdo con el diseño de biblioteca. Todos los clones tuvieron las mismas secuencias marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera (véase Figura 6).

Un diferente conjunto de clones incluía contraselección con 10 µg/ml de poliubiquitina de un enlace de lisina diferente (bien poliubiquitina con enlaces K48 o bien poliubiquitina con enlaces K63) en los ciclos de selección dos a cuatro. Se usaron diez µl del fago eluido del cuarto ciclo de selección para infectar *E. coli* CJ236 crecientes durante 20 minutos, que después se cultivaron durante una noche en agar sólido que contenía carbenicilina. Se añadieron quince mililitros de caldo de cultivo 2YT complementado con carbenicilina y cloranfenicol a la placa para resuspender las células CH236 que contenían fagémidos. Se añadió fago auxiliar M13-K07. Después de incubación durante una hora a 37 °C con agitación, se añadieron 2,5 ml de la suspensión a 250 ml del caldo de cultivo 2YT complementado con carbenicilina y kanamicina. La suspensión se dejó crecer durante una noche.

Los fagos se recogieron por precipitación con polietilenglicol, y se aisló el ADN de Kunkel usando un kit de centrifugación M13 (Qiagen). Se usó un microgramo de molde de Kunkel para mutagénesis de Kunkel (véase, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)) con el oligonucleótido F1560-2 (TCTTGACAAAACCTCACCATCACCATCACCATCACTAGGGCGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTT) (SEC ID N°: 150). La reacción de mutagénesis se transformó en *E. coli* XL1-blue y se cultivó en agar sólido que contenía carbenicilina durante una noche. Después se seleccionaron clones individuales y se cultivaron como anteriormente y se exploraron frente a poliubiquitina con enlaces K48 y K63, monoubiquitina, BSA y anticuerpo anti-pentaHis (Qiagen) en un ELISA de fagos como se ha descrito anteriormente. Los clones que se identificó que eran específicos para poliubiquitina con enlaces K48 o para poliubiquitina con enlaces K63 se sometieron a análisis de secuencia de ADN. Las secuencias de aminoácidos de regiones hipervariables HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 se muestran en las Figuras 8A-C (específicas para poliubiquitina con enlaces K48) y 9A y 9B (específicas para poliubiquitina con enlaces K63). La HVR de cadena ligera para cada clon no se secuenció, pero basándose en la naturaleza de la biblioteca de YS-B, se esperaba que las secuencias de HVR-L1 y HVR-L2 fueran invariantes, mientras que se esperaba que la secuencia HVR-L3 fuera específica de clon. La secuencia de HVR-L1 es RASQSVSSAVA (SEC ID N°: 79) y la secuencia de HVR-L2 es SASSLYS (SEC ID N°: 80) de acuerdo con el diseño de biblioteca. Todos los clones tuvieron las mismas secuencias marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera (véase Figura 6).

(B) Producción de Fab

Para producción de Fab, se usaron sobrenadantes de fagos de clones únicos positivos para el marcador de pentahistidina para infectar en *E. coli* FF34B8, una línea celular en la que el episoma F' se añadió a la cepa 34B8 emparejando con XL1 y cultivando en medios sólidos selectivos. Las células infectadas se sembraron en estrías en agar sólido que contenía carbenicilina y se cultivaron durante una noche. Se seleccionaron colonias individuales de FF34B8 que contenían fagémido de las placas y se cultivaron durante una noche a 37 °C en LB que contenía carbenicilina. Esos cultivos se usaron después para inocular 500 ml de medio CRAP completo (3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico 2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura (certificado), 5,36 g de Hycase SF (Sheffield), pH ajustado a 7,3 mediante la adición de KOH y volumen ajustado a 872 ml con agua ultrapura, esterilizado por autoclave, enfriado a 55 °C, al que se añadió (por l) 110 ml de MOPS 1 M, pH 7,3, 11 ml de glucosa al 50 % y 7 ml de MgSO₄ 1 M) que contenía carbenicilina, y se cultivó durante 24 horas a 30 °C con agitación. Las células se recogieron por centrifugación y los sedimentos celulares se almacenaron a -20 °C. Se purificaron Fab resuspendiendo cada sedimento celular en 35 ml de tampón de lavado frío (PBS + NaCl 150 mM) que contenía lisozima 0,2 mg/ml y DNasa I 0,3 U/ml. Los sedimentos celulares resuspendidos se transfirieron a tubos de centrífuga de 50 ml y se agitaron vorticialmente rápidamente a 25 °C durante 45 minutos. Los sedimentos se centrifugaron y el lisado se cargó en columnas de proteína G-sepharose de 1 ml preequilibradas con tampón de lavado a 4 °C. Las columnas se lavaron con 50 ml de tampón de lavado frío, se eluyeron con 3 ml de ácido acético 0,1 M y se neutralizaron con 150 µl de base Tris 2 M. Se intercambiaron los tampones de Fab eluidos por PBS y se concentraron usando filtros de centrífuga Centriprep 10 (Millipore). Las concentraciones de Fab resultantes se determinaron espectrofotométricamente (1 DO_{280nm} = 1,55 mg/ml). Los Fab concentrados se almacenaron a 4 °C.

Cada Fab se incluyó en un ensayo proteico de ELISA, como se ha descrito anteriormente, para determinar su afinidad relativa por poliubiquitina con enlaces K48 y con enlaces K63, y para confirmar que el Fab no era reactivo con monoubiquitina o BSA. Los Fab apu01-015 tenían mayor especificidad por poliubiquitina con enlaces K48 que por poliubiquitina con enlaces K63. Los Fab apu17-apu24 demostraron mayor especificidad por poliubiquitina con enlace K63 que por poliubiquitina con enlaces K48 en el ELISA. No se produjo Apu16 como un Fab.

Todos los Fab se sometieron a análisis de secuencia de ADN. Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables HVRH1, HVR-H2, HVR-H3 y HVR-L3 para cada Fab que se unieron específicamente con poliubiquitina con enlaces K48 se muestran en las Figuras 10A-C. Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables HVRH1, HVR-H2, HVR-H3 y HVR-L3 para cada Fab que se unieron específicamente con poliubiquitina con enlaces K63 se muestran en las Figuras 11A-C. Las secuencias marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera para cada Fab aparecen en la Figura 6. Las primeras dos regiones hipervariables de cadena ligera, HVR-L1 y HVR-L2, fueron idénticas para cada clon, de acuerdo con el diseño de biblioteca (véase SEC ID N°: 79 y 80, anteriormente).

(C) Análisis de afinidad de Fab aislados

Se determinados las afinidades de Fab seleccionados (véase sección (B), anterior) por ubiquitina y sus formas con enlaces de lisina por resonancia de plasmón superficial usando un sistema BIACORE® 3000 (Biacore). Se inmovilizaron aproximadamente 100 unidades de resonancia de ubiquitina, diubiquitina con enlaces K48 o K63 o poliubiquitina con enlaces K48 o K63 (longitudes de cadena de 3 a 7) en diferentes celdas de flujo de microplacas CM5 usando el protocolo de acoplamiento de amina proporcionado por el fabricante. En cada experimento, la celda de flujo 1 se activó y se bloqueó con etanolamina sin inmovilizar proteína, para usarla para la resta de referencia. Se inyectaron varias diluciones en serie de proteínas Fab (1,6-100 nM) de cada uno de apu01 a apu24 (50 µl en total a un caudal de 25 µl/minuto) sobre cada celda de flujo. La señal para cada celda de flujo se registró y se restó la señal de referencia. Después de un periodo de disociación (5 minutos), la superficie de la microplaca se regeneró con 13 µl de HCl 20 mM. Se muestran curvas de unión ejemplares para los Fab apu09 y apu18 en las Figuras 12 y 13. Apu09 se une con poliubiquitina con enlaces K48, pero no con poliubiquitina con enlaces K63, como se muestra en la Figura 12. La Figura 13A muestras las curvas de unión para apu18 con poliubiquitina con enlaces K48. Aunque se observa algo de unión, es sustancialmente menos que la unión observada con poliubiquitina con enlaces K63 (Figura 13B). Se realizaron análisis similares para cada Fab.

Las constantes cinéticas y constantes de unión se calcularon simultáneamente por análisis de regresión no lineal usando programas informáticos proporcionados por el fabricante, y se muestran en la Tabla B. El término "NB" en la Tabla B indica que no se detectó unión para la interacción indicada. El término "nd" en la Tabla B indica que no se midieron datos para la interacción indicada. Los resultados muestran que las constantes cinéticas de un Fab particular para unión con diubiquitina son muy similares a las de unión con una poliubiquitina. Por lo tanto, los Fab parecen reconocer un enlace isopeptídico particular entre dos restos de ubiquitina.

Expediente del Mandatario P2260R1

TABLA B: Constantes cinéticas de Fab anti-poliubiquitina como se mide por análisis de BIACORE®

	poliubiquitina con enlaces K48				poliubiquitina con enlaces K63				diubiquitina con enlaces K48				diubiquitinas con enlace K63			
	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	
Apu01	1,92x10 ⁶	3,49x10 ⁻³	1,82													
Apu02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,28x10 ⁶	1,38x10 ⁻²	4,20							
Apu03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,46x10 ⁵	6,96x10 ⁻³	12,70							
Apu04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,79x10 ⁵	5,33x10 ⁻³	11,10				8,27x10 ⁴	0,0112	135,00	
Apu05	1,69x10 ⁶	4,16x10 ⁻³	2,46				5,38x10 ⁵	5,89x10 ⁻³	10,90				3,70x10 ⁵	0,0232	62,70	
Apu06	1,04x10 ⁶	6,58x10 ⁻³	6,31				3,70x10 ⁶	1,46x10 ⁻²	3,94							
Apu07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2,60x10 ⁶	2,20x10 ⁻²	8,5							
Apu08	9,04x10 ⁵	8,71x10 ⁻³	9,64				1,05x10 ⁶	9,93x10 ⁻³	9,49							
Apu09	1,05x10 ⁶	9,79x10 ⁻³	9,36				1,12x10 ⁶	0,0127	11,30							
Apu10	8,45x10 ⁵	5,62x10 ⁻³	6,65				1,81x10 ⁶	0,0169	9,32							
Apu11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,12x10 ⁶	0,016	14							
Apu12	5,73x10 ⁵	7,07x10 ⁻³	12,30				9,04x10 ⁵	0,0177	19,60							
Apu13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,13x10 ⁵	0,0108	34,50							
Apu14	1,58x10 ⁶	1,08x10 ⁻²	6,85				1,15x10 ⁵	0,016	139,00							
Apu15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,18x10 ⁶	2,66x10 ⁻²	8,35							
Apu16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6,91x10 ⁵	7,31x10 ⁻³	10,60				1,28	0,0212	1650,00	
Apu17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd				nd	nd	nd	
Apu18	2,32x10 ⁵	0,0169	72,80	1,09x10 ⁶	8,17x10 ⁻³	7,53	1,73x10 ⁶	1,95x10 ⁻²	11,30				1,69x10 ⁶	1,75x10 ⁻²	10,40	
Apu18*							3,16x10 ⁵	1,48x10 ⁻²	46,90				1,01x10 ⁶	1,54x10 ⁻²	15,30	
Apu19			NB						NB							
Apu20	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB							
Apu21	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB							
Apu22	nd	nd	nd	1,53x10 ⁵	0,0191	125,00	6,19x10 ⁵	1,28x10 ⁻²	20,70				nd	nd	nd	
Apu23	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB							
Apu24	nd	nd	nd	nd	nd	nd			NB							

* Un segundo análisis de Biacore de Apu 18 confirmó las constantes cinéticas previamente obtenidas para la interacción con diubiquitina con enlaces K63.

(D) Transferencia de Western

Se separaron tetraubiquitina (con enlaces K48 o enlaces K63 según sea apropiado) y diubiquitina (bien con enlaces K48 o bien con enlaces K63) (Boston Biochem) en geles de poliacrilamida y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon los sitios de unión no específica en las membranas incubando las membranas durante una noche a 4 °C en reactivo de bloqueo Qiagen 0,5 % (Qiagen). Las membranas bloqueadas se colocaron en un aparato de minitransferencia. Se aplicaron clones de Fab (1 µg/ml) a secciones en serie de la membrana en reactivo de bloqueo Qiagen 0,5 % (Qiagen). Después de un periodo de incubación de una hora, las membranas se lavaron. Los anticuerpos anti-ubiquitina unidos con la membrana se revelaron usando anticuerpo anti-penta-histidina conjugado con HRP (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los Fab específicos de poliubiquitina con enlaces K48 producidos a partir de clones apu01 a apu15 se unieron específicamente con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada con nitrocelulosa (véase Figura 19B). No se observó unión de los Fab de poliubiquitina con enlaces K63 producidos a partir de los clones apu17 a apu24 para poliubiquitina con enlaces K63 inmovilizada en membranas de nitrocelulosa (véase Figura 19A).

EJEMPLO 2: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LIBRO DE SEGUNDA GENERACIÓN

Se construyeron bibliotecas de segunda generación para presentación Fab a partir de los fagémidos que codifican los clones previamente identificados apu05 (selectivos para poliubiquitina con enlaces K48) y apu18 (selectivos para poliubiquitina con enlaces K63) (véase Figuras 10 y 11). Se usaron fagos de esos clones para infectar células CJ236 para preparar moldes de ADN de Kunkel. Estos moldes se mutaron posteriormente para insertar codones de terminación, y los moldes que contenían terminación se usaron en la construcción de bibliotecas de la siguiente manera.

El Fab apu05 se mutó de acuerdo con dos esquemas diferentes para crear dos bibliotecas derivadas de apu05 diferentes. En la primera biblioteca, solamente se mutó HVR-H3. HVR-H3 se modificó en primer lugar para incluir un codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una mutagénesis utilizando cuatro oligonucleótidos mutagénicos. El oligonucleótido que codificaba el codón de terminación en todos los casos fue CGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID Nº: 365). Los primeros tres oligonucleótidos mutagénicos fueron tres permutaciones de la misma secuencia deseada, en la que se fijó un resto de tirosina y cada resto de tirosina restante se distribuyó al azar usando el conjunto de codones mixto NNS (en el que N corresponde a G, C, A o T y S corresponde a G o C); el aminoácido en la posición 100b se seleccionó a partir de fenilalanina, metionina, leucina e isoleucina; el aminoácido en la posición 100a se seleccionó a partir de glicina y alanina; y los aminoácidos restantes se distribuyeron al azar de forma suave. La distribución al azar suave en este contexto indica que ciertas posiciones de nucleótidos estaban ocupadas el 70 % del tiempo por la base indicada y ocupadas el 10 % del tiempo por una de las otras tres bases. Para los oligonucleótidos a continuación, en los que se incluyó dicha distribución al azar suave en una base particular, la presencia de la distribución al azar suave se indica por la presencia de un número en esa posición de base. El número "5" indica que la base adenina está presente el 70 % del tiempo en esa posición, mientras que las bases guanina, citosina y timina están cada una presentes el 10 % del tiempo. De forma similar, el número "6" se refiere a guanina, "7" a citosina y "8" a timina, en los que en cada caso, cada una de las otras tres bases está presente solamente el 10 % del tiempo. Las primeras tres secuencias oligonucleotídicas mutagénicas fueron: GTCTATTATTGTGCTCGC567TAC567NNSNNS567GSTWTS GACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID Nº: 367), CGTCTATTATTGTGCTCGC567NNS567TACNNS567 GSTWTS GACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID Nº: 368), y CGTCTATTATTGTGCTCGC567 NNS567NNSTAC567GSTWTS GACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID Nº: 369). El cuarto oligonucleótido mutagénico incluyó distribución al azar de las tirosinas en las posiciones 96, 98 y 99 usando el conjunto de codones mixto NNS; selección del aminoácido en la posición 100b de fenilalanina, metionina, leucina e isoleucina; selección del aminoácido en la posición 100a de glicina y alanina, y distribución al azar suave en todas las otras posiciones, de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. La secuencia del cuarto oligonucleótido fue CGTCTATTATTGTGCTCGC567NNS567NNSNNS567GSTWTS GACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID Nº: 370).

En la segunda biblioteca de apu05, se mutaron HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, y HVR-L3. HVR-H1 se modificó de tal modo que las serinas en las posiciones 30 y 33 se distribuyeron al azar usando el conjunto de codones mixto NNS (en el que N corresponde a G, C, A o T y S corresponde a G o C); el aminoácido en la posición 29 se seleccionó de los aminoácidos fenilalanina, leucina, isoleucina y valina; y el aminoácido en la posición 34 se seleccionó de isoleucina y metionina. Los oligonucleótidos usados para mutar HVR-H1 de apu05 fueron GCAGCTTCTGGCTTCAACTAATAACACTGGGTGCGTCAGG (SEC ID Nº: 371) y GCAGCTTCTGGCTTCAACNTC NNSACTCTNNSATSCACTGGGTGC GTCAGG (SEC ID Nº: 372). HVR-H2 se modificó de modo que la tirosina en la posición 52 se distribuyó al azar usando el conjunto de codones mixto NNS y el aminoácido en la posición 52a se seleccionó de prolina y serina. Los oligonucleótidos usados para mutar HVR-2 fueron GGCCTGGAATGGGTTCATATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID Nº: 373) y GGCCTGGAATGGGTTCATCTATCCTTACTCTTACACCTCTTATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID Nº: 374). HVR-H3 H2 se modificó de modo que la tirosina en la posición 99 y la serina en la posición 10 se distribuyeron

al azar usando el conjunto de codones mixto NNS; el aminoácido en la posición 100a se seleccionó de glicina y alanina; y el aminoácido en la posición 100b se seleccionó de fenilalanina, metionina, leucina e isoleucina. Los oligonucleótidos usados para mutar HVR-H3 fueron

5 CGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°: 365) y
 CGTCTATTATTGTGCTCGCTCTTACTCTTACNNSNNSGSTWTSGACTACTGGGGTCA AGG (SEC ID N°: 375).
 HVR-L3 se modificó de modo que la posición S91 se distribuyó al azar de acuerdo con el conjunto de codones mixto
 NNS y la posición I96 se seleccionó de fenilalanina, isoleucina y valina. Los oligonucleótidos usados para mutar
 HVR-L3 fueron CGCAACTTATTACTGTCAGCAATAATAACGTTCCGGACAGGGTACC (SEC ID N°: 376) y
 CGCAACTTATTACTGTCAGCAANNSTCTTACTCTTCTCTGDTTACGTTCCGGACAGGGTACC (SEC ID N°: 378).

10 Se prepararon seis bibliotecas derivadas de apu18 diferentes por seis esquemas de mutagénesis diferentes de
 apu18. En la primera biblioteca, solamente se mutó HVR-H3. HVR-H3 se modificó en primer lugar para incluir un
 codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una metodología de mutagénesis utilizando siete
 oligonucleótidos mutagénicos. El oligonucleótido que codificaba el codón de terminación en todos los casos fue
 15 CGTCTATTATTGTGCTCGCTAATAAGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°: 366). Los primeros seis
 oligonucleótidos mutagénicos fueron seis permutaciones de la misma secuencia deseada, en los que dos restos de
 tirosina o triptófano eran fijos y cada resto de tirosina y triptófano restante se distribuyó al azar usando el conjunto de
 codones mixto NNS (en el que N corresponde a G, C, A o T y S corresponde a G o C); el aminoácido en la posición
 20 100c se seleccionó de fenilalanina, metionina, leucina e isoleucina; el aminoácido en la posición 100b se seleccionó
 de glicina y alanina; y los aminoácidos restantes se distribuyeron al azar de forma suave de acuerdo con la
 nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. Las primeras seis secuencias oligonucleotídicas
 mutagénicas fueron:

25 CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACTAC565NNSNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 379),
 CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSNNS565TGGTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 380),
 CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACBBS565NNSTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 381),
 30 CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSTAC565TGGNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 382),
 CGTCTATTATTGTGCTCGC655TACNNS565TGGNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 383), y
 CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSTAC565NNSTAC577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 35 384).

El séptimo oligonucleótido mutagénico incluyó distribución al azar de las tirosinas en las posiciones 96, 97 y 100 y el
 triptófano en la posición 99 usando el conjunto de codones mixto NNS; selección del aminoácido en la posición 100b
 40 de fenilalanina, metionina, leucina e isoleucina; selección del aminoácido en la posición 100c de fenilalanina,
 metionina, leucina e isoleucina; selección del aminoácido en la posición 100b de glicina y alanina, y distribución al
 azar suave en todas las demás posiciones, de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita
 anteriormente. La secuencia del séptimo oligonucleótido fue:

45 CGTCTATTATTGTGCTCGC655NNSNNS565NNSNNS577GSTWTSGACTACTGGGGTCAAGG (SEC ID N°:
 385).

En la segunda biblioteca de apu18, solamente se mutó HVR-H2. HVR-2 se modificó en primer lugar para incluir un
 codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una metodología de mutagénesis utilizando cuatro
 oligonucleótidos mutagénicos. El oligonucleótido que codificaba el codón de terminación en todos los casos fue
 50 GGCCTGGAATGGGTTGCATAATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID N°: 373). Los primeros tres
 oligonucleótidos mutagénicos fueron tres permutaciones de la misma secuencia deseada, en la que un resto de
 tirosina estaba fijo y cada tirosina restante y la serina en la posición 52 se distribuyeron al azar usando el conjunto
 de codones mixto NNS (en el que N corresponde a G, C, A o T y S corresponde a G o C); el aminoácido en la
 posición 52a se seleccionó de prolina y serina; el aminoácido en la posición 55 se seleccionó de glicina y serina; la
 55 isoleucina en la posición 51 y la treonina en la posición 57 estaban fijas; y los aminoácidos restantes se distribuyeron
 al azar de forma suave de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. Las
 primeras tres secuencias oligonucleotídicas mutagénicas fueron:

60 GGCCTGGAATGGGTTGCATACATCNSYCTNNSNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGT CAAGG (SEC
 ID N°: 386),
 GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTTACNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGT CAAGG (SEC
 ID N°: 387), y
 GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTNNSACRGC567ACC567TATGCCGATAGCGT CAAGG (SEC
 ID N°: 388).

El cuarto oligonucleótido mutagénico incluyó distribución al azar de las tirosinas en las posiciones 50, 53 y 54 usando el conjunto de codones mixto NNS; selección del aminoácido en la posición 52a de fenilalanina y serina; selección del aminoácido en la posición 55 de glicina y serina; fijación de los restos de isoleucina y treonina en las posiciones 51 y 57 respectivamente; y distribución al azar suave en todas las otras posiciones, de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. La secuencia del cuarto oligonucleótido fue:

GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATCNSYCTNNSNNSRGC567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID N°: 389).

En la tercera biblioteca de apu18, se mutaron HVR-H2 y HVR-H3. HVR-H2 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H2 en la segunda biblioteca de apu18, usando los mismos cuatro oligonucleótidos mutagénicos. HVR-H3 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizada a HVR-H3 en la primera biblioteca de apu18, usando los mismos primeros seis oligonucleótidos mutagénicos.

En la cuarta biblioteca de apu18, se mutaron HVR-H3 y HVR-L3. HVR-H3 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H3 en la primera biblioteca de apu18, usando los mismos primeros seis oligonucleótidos mutagénicos. HVR-L3 se modificó en primer lugar para incluir un codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una mutagénesis usando un oligonucleótido mutagénico. Dentro de HVR-L3, las tirosinas en las posiciones 91 y 94 y la serina en la posición 95a se distribuyeron al azar usando el conjunto de codones mixto NNS; la leucina en la posición 95b se seleccionó de fenilalanina, isoleucina y valina; y las serinas en las posiciones 92, 93 y 95 se distribuyeron al azar de forma suave de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. Los oligonucleótidos usados para la mutagénesis de HVR-L3 fueron CGCAACTTATTACTGTGTCAGCAATAATAAACGTTCCGGACAGGGTACC (SEC ID N°: 376) y CGCAACTTATTACTGTGTCAGCAANNS567567NNS567NNSCTGDTTACGTTCCGGACAGGGTA CC (SEC ID N°: 390).

En la quinta biblioteca de apu18, se mutaron HVR-H1 y HVR-H2. HVR-H2 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a las HVR-H2 en el la segunda biblioteca de apu18, usando los mismos cuatro oligonucleótidos mutagénicos. HVR-H1 se modificó en primer lugar para incluir un codón de terminación; la serina en la posición 30 y la tirosina en la posición 33 se distribuyeron al azar usando el conjunto de codones mixto NNS; el aminoácido en la posición 29 se seleccionó de fenilalanina, leucina, isoleucina y valina; el aminoácido en la posición 34 se seleccionó de isoleucina y metionina, y los aminoácidos en las posiciones 31 y 32 se distribuyeron al azar de forma suave de acuerdo con la nomenclatura de distribución al azar suave descrita anteriormente. Los oligonucleótidos usados para la mutagénesis de HVR-H1 fueron:

GCAGCTTCTGGCTTCAACTAATAAACTGGGTGCGTCAGG (SEC ID N°: 371) y
GCAGCTTCTGGCTTCAACNTCNNS567567NNSATSCACTGGGTGCGTCAGG (SEC ID N°: 391).

En la sexta biblioteca de apu18, se mutaron HVR-H1 y HVR-H2 y HVR-L3. HVR-H1 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a la HVR-H1 en la quinta biblioteca de apu18, usando el mismo oligonucleótido mutagénico. HVR-H2 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a la HVR-H2 en la segunda biblioteca de apu18, usando los mismos cuatro oligonucleótidos mutagénicos. HVR-L3 se modificó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a la HVR-L3 en la cuarta biblioteca de apu18, usando el mismo oligonucleótido mutagénico.

Se usaron reacciones de mutagénesis para cada una de las dos bibliotecas derivadas de apu5 y cada una de las seis bibliotecas derivadas de apu18 para transformar *E. coli* XL-1 electrocompetentes por electroporación. Se permitió que las células se recuperaran durante 30 minutos a 37 °C con agitación en medio SOC. Se reservaron veinte microlitros del medio SOC que contenía células para determinar el número de transformantes, y el resto se transfirió después a 500 ml de 2YT que contenía carbenicilina y 10^{10} fagos auxiliares M13K07 por mililitro. Después de 45 minutos a 37 °C con agitación, el caldo de cultivo se complementó con kanamicina y se dejó crecer durante una noche a 37 °C con agitación. El número de transformantes para cada biblioteca fue $> 10^9$. Los fagos se recogieron y se concentraron a partir de caldo de cultivo por centrifugación y precipitación con PEG, y posteriormente se usaron en ciclos de selección.

Se inmovilizaron poliubiquitina con enlaces K48 y poliubiquitina con enlaces K63 en diferentes placas Maxisorp (NUNC) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1(A). Cada biblioteca se clasificó por separado frente a su diana respectiva (poliubiquitina con enlaces K48 para las dos bibliotecas derivadas de apu05, poliubiquitina con enlaces K63 para las seis bibliotecas derivadas de apu18) para un ciclo con la adición de monoubiquitina 3 μ M en el tampón de clasificación. El fago eluido se amplificó y se agrupó (dos grupos, uno para cada diana de poliubiquitina con enlaces de lisina) para ciclos adicionales de clasificación.

Se clasificaron por fase de solución ciclos de selección posteriores. Los grupos de fagos se incubaron con cadenas de poliubiquitina biotiniladas (Sulfo-NHS-biotina, Pierce) durante una a dos horas a temperatura ambiente en tampón de clasificación en solución (PBST con Superblock al 0,5% (Pierce)). La mezcla se diluyó de cinco a diez veces en tampón de clasificación en solución y se añadió a pocillos recubiertos con neutravidina para una captura breve (5 minutos) de poliubiquitina biotinilada. Una reacción que contenía cadenas de poliubiquitina no biotiniladas actuó

como un control para controlar la unión de fagos de fondo. Las placas se lavaron con PBST y se eluyeron con HCl 0,1 M durante 10 minutos.

La rigurosidad se moduló de tres maneras: mediante la concentración de poliubiquitina biotinilada; mediante la adición de poliubiquitina no biotinilada en exceso para competir por la unión antes de la captura en pocillos recubiertos con neutravidina; y mediante la duración de la competición. Para cada ciclo de clasificación, se añadió monoubiquitina y poliubiquitina del otro enlace a una concentración de 30 µg/ml al tampón de clasificación durante la primera etapa de incubación. El primer ciclo de clasificación en solución empleó poliubiquitina biotinilada 20 nM incubada con fago durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó después diez veces en tampón de clasificación en solución, y se capturó usando pocillos recubiertos con neutravidina durante cinco minutos. Para el segundo ciclo el fago se equilibró con poliubiquitina biotinilada 20 nM, como el ciclo 1, pero se diluyó diez veces en tampón de clasificación en solución que contenía 30 µg/ml de poliubiquitina no biotinilada (con enlaces K48 para selección de K48, con enlaces K63 para selección de K63) durante quince minutos de selección de velocidad de disociación seguido de captura en pocillos recubiertos con neutravidina. El tercer ciclo de clasificación en solución fue como se ha descrito para el segundo ciclo, pero se incluyó además poliubiquitina biotinilada 5 nM y 30 minutos de selección de velocidad de disociación. Después de un ciclo de clasificación en placas y tres ciclos de clasificación en solución, los clones individuales seleccionados de la segunda generación se cultivaron en un formato de 96 pocillos como se describe. Los clones individuales se exploraron por ELISA de fagos y secuenciaron.

Después del primer ciclo de clasificación de solución, se observó un enriquecimiento de hasta 40 veces para las bibliotecas basadas en apu05 y un enriquecimiento de hasta 7 veces para las bibliotecas en apu18 (véase Tabla C). Se obtuvo un enriquecimiento 11 veces adicional para los clones específicos de K48 y un enriquecimiento 3 veces adicional para los clones específicos de K63 después de la segunda selección (clasificación en solución para velocidad de disociación lenta) (véase Tabla C). La tercera selección (tanto clasificación de afinidad como clasificación de velocidad de disociación) dio como resultado un enriquecimiento 18 veces para los clones específicos de K48 y un enriquecimiento de cuatro veces para los clones específicos de K63 (véase Tabla C).

Tabla C: Resultados de la clasificación en solución de la biblioteca de anticuerpos anti-poliubiquitina de segunda generación

Primera selección (clasificación en solución para afinidad)						
	5 nM		10 nM		20 nM	
	Tamaño	Enriquecimiento	Tamaño	Enriquecimiento	Tamaño	Enriquecimiento
Basado en apu05	2,00x10 ⁴	20,00	3,00x10 ⁴	30,00	4,00x10 ⁴	40
Basado en apu18	2,20x10 ³	1,83	2,00x10 ³	1,67	8,40x10 ³	7
Segunda selección (clasificación en solución para velocidad de disociación lenta)						
	5 min		10 min		15 min	
	Tamaño	Enriquecimiento	Tamaño	Enriquecimiento	Tamaño	Enriquecimiento
Basado en apu05	4,00x10 ⁴	17,78	4,00x10 ⁴	17,78	2,50x10 ⁴	11,11
Basado en apu18	5,50x10 ³	4,07	7,00x10 ³	5,19	4,50x10 ³	3,33
Tercera selección (clasificación en solución tanto para afinidad como para velocidad de disociación lenta)						
	5 nM y 30 min					
	Tamaño	Enriquecimiento				
Basado en apu05	4,70x10 ³	18,60				
Basado en apu18	1,00x10 ²	4,25				

Se identificaron sesenta y ocho clones únicos que se unían específicamente con poliubiquitina con enlaces K48; esos clones se sometieron a análisis de secuencia de ADN. Las secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de esos clones se muestran en las Figuras 14A-F. Se identificaron treinta y un clones únicos que se unían específicamente con poliubiquitina con enlaces K63; esos clones también se sometieron a análisis de secuencia. Las secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 de esos clones se muestran en las Figuras 15A-C. La HVR de cadena ligera para cada uno de los clones específicos de poliubiquitina con enlaces K48 y poliubiquitina con enlaces K63 no se secuenció, pero, como con apu05 y apu18, se esperaba que las secuencias de HVR-L1 y HVR-L2 fueran invariantes, mientras que se esperaba que la secuencia de HVR-L3 fuera específica de clon. La secuencia de HVR-L1 es RASQSVSSAVA (SEC ID N°: 79) y la secuencia de HVR-L2 es SASSLYS (SEC ID N°: 80), de acuerdo con el diseño de biblioteca. Todos los clones tuvieron las mismas secuencias marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera (véase Figura 6).

Los veinte clones con la mayor unión observada (diez específicos de poliubiquitina con enlaces K48 y diez específicos de poliubiquitina con enlaces K63) se produjeron como Fab como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los Fab apu2.01 hasta apu2.20 se sometieron a análisis de secuencia de ADN. Las secuencias de HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3 y HVR-L3 de esos clones se muestran en las Figuras 16A y B (Fab específicos de K48) y 17A y B (Fab

específicos de K63).

Los Fab apu2.01 a apu2.20 se incluyeron en un ensayo de proteínas de ELISA para determinar sus afinidades relativas por poliubiquitina con enlaces K48 y con enlaces K63, y para confirmar que los Fab no eran reactivos con monoubiquitina o BSA (véase Figura 18). Los clones de Apu 2.11 y 2.12 demostraron cada uno aproximadamente 300 veces mayor afinidad por poliubiquitina con enlaces K63 que por poliubiquitina con enlaces K48 en ese ensayo. Apu2.20 y 2.16 tuvieron menores diferencias, pero aún notables, (aproximadamente 30 veces mayores y aproximadamente 10 veces mayores, respectivamente) en la afinidad por poliubiquitina con enlaces K63 en comparación con enlaces K48. No se detectó unión de clones apu2.01-apu2 con poli o diubiquitina con enlaces K63.

Cada Fab también se analizó por BIAcore como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1(C). Las constantes cinéticas y constantes de unión obtenidas se muestran en la Tabla D. El término "NB" en la Tabla D indica que no se detectó unión para la interacción indicada.

TABLA D: Constantes cinéticas de Fab anti-poliubiquitina como se mide por análisis de BIAcore

	poliubiquitina con enlaces K63			diubiquitina con enlaces K48			diubiquitina con enlaces K63		
	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)	k_{on} (1/M·s)	k_{off} (1/s)	K_d (nM)
Apu2.01			NB	633×10^5	$1,49 \times 10^{-2}$	23,5			NB
Apu2.02			NB	$1,11 \times 10^6$	$1,01 \times 10^{-2}$	9,16			NB
Apu2.03			NB	$8,67 \times 10^5$	$2,66 \times 10^{-3}$	3,07			NB
Apu2.04			NB	$6,22 \times 10^5$	$9,39 \times 10^{-3}$	15,10			NB
Apu2.05			NB	$1,20 \times 10^6$	$6,09 \times 10^{-3}$	5,06			NB
Apu2.06			NB	$1,28 \times 10^6$	$2,40 \times 10^{-3}$	1,87			NB
Apu2.07			NB	$2,70 \times 10^6$	$3,18 \times 10^{-3}$	1,18			NB
Apu2.08			NB	$1,25 \times 10^6$	$7,21 \times 10^{-3}$	5,76			NB
Apu2.09			NB	$7,15 \times 10^5$	$4,78 \times 10^{-3}$	6,69			NB
Apu2.10			NB	$3,28 \times 10^6$	$3,99 \times 10^{-3}$	1,21			NB
Apu05			NB	$2,44 \times 10^6$	$1,07 \times 10^{-2}$	4,37			NB
Apu2.11	$2,49 \times 10^5$	$7,11 \times 10^{-3}$	28,6	$1,68 \times 10^4$	$1,24 \times 10^{-2}$	738	$3,12 \times 10^5$	$1,02 \times 10^{-2}$	32,7
Apu2.12	$4,76 \times 10^5$	$9,68 \times 10^{-3}$	20,3	$5,66 \times 10^3$	$7,88 \times 10^{-3}$	1390	$5,49 \times 10^5$	$1,51 \times 10^{-2}$	27,5
Apu2.13	$4,89 \times 10^5$	$2,41 \times 10^{-3}$	4,93	$2,08 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-2}$	103	$5,83 \times 10^5$	$4,11 \times 10^{-3}$	7,05
Apu2.14	$2,09 \times 10^5$	$7,08 \times 10^{-3}$	34,0	$4,97 \times 10^3$	$1,15 \times 10^{-2}$	2310	$2,14 \times 10^5$	$1,06 \times 10^{-2}$	49,6
Apu2.15	$9,07 \times 10^5$	$9,98 \times 10^{-3}$	11,0	$1,43 \times 10^4$	$1,23 \times 10^{-2}$	856	$1,10 \times 10^6$	$1,55 \times 10^{-2}$	14,0
Apu2.16	$1,68 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-2}$	107	$4,11 \times 10^1$	$1,73 \times 10^{-3}$	42000	$1,38 \times 10^5$	$1,27 \times 10^{-2}$	92,1
Apu2.17	$1,19 \times 10^6$	$1,35 \times 10^{-2}$	11,3	$6,90 \times 10^3$	$2,73 \times 10^{-3}$	396	$1,13 \times 10^6$	$2,89 \times 10^{-2}$	25,6
Apu2.18	$1,49 \times 10^5$	$1,89 \times 10^{-2}$	128	$4,98 \times 10^3$	$5,36 \times 10^{-3}$	1080	$2,66 \times 10^5$	$2,53 \times 10^{-2}$	95,0
Apu2.19	$8,97 \times 10^5$	$8,47 \times 10^{-3}$	9,44	$2,54 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-2}$	48,9	$8,76 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-2}$	16,1
Apu2.20	$2,93 \times 10^5$	$1,77 \times 10^{-2}$	60,7	$4,02 \times 10^3$	$3,77 \times 10^{-3}$	939	$4,19 \times 10^5$	$2,50 \times 10^{-2}$	59,7
Apu18	$1,09 \times 10^6$	$8,17 \times 10^{-3}$	7,53	$3,16 \times 10^5$	$1,48 \times 10^{-2}$	46,9	$1,01 \times 10^6$	$1,54 \times 10^{-2}$	15,3

Varios de los Fab basados en apu05 tuvieron K_d menores que las del Fab correspondiente a apu05 para diubiquitina con enlaces K48, que representan unión más estrecha con poliubiquitina. Cada uno de los Fab apu2.11-2.20 se unieron no solamente con poliubiquitina con enlaces K63 sino también, en menor grado, con diubiquitina con enlaces K48. Aunque solamente apu2.13 tuvo una K_d menor que apu18, su K_d para diubiquitina con enlaces K48 fue mayor que la de apu18. Cada uno de apu 2.11, 2.12, 2.16 y 2.20 tuvo mejores relaciones de K_d para poliubiquitina con enlaces K63 y K_d para diubiquitina con enlaces K48 que apu18. Las constantes cinéticas observadas para unión de los Fab basados en apu18 con poliubiquitina con enlaces K63 fueron similares a las observadas para la unión con diubiquitina con enlaces K63.

La capacidad de cada Fab para unirse específicamente con poliubiquitina inmovilizada en una membrana de nitrocelulosa también se evaluó por transferencia de Western como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1(D). Se inmovilizaron tetraubiquitina que contenía un enlace K48 o K63, diubiquitina que contenía el enlace de lisina opuesto del de la tetraubiquitina (por ejemplo, diubiquitina con enlaces K63 cuando se usaba tetraubiquitina con enlaces K48, o diubiquitina con enlaces K48 cuando se usaba tetraubiquitina con enlaces K63), y monoubiquitina en membranas de nitrocelulosa, y se evaluaron los Fab apu2.01-2.20 con respecto a sus capacidades para reconocer las tres moléculas inmovilizadas (Figuras 20A y 20B). Ninguno de los Fab reconoció específicamente la monoubiquitina. Apu2.01-apu2.10 reconocieron cada uno específicamente tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada pero no reconocieron diubiquitina con enlaces K63 inmovilizada (véase Figura 20A). Aparecieron varias

otras bandas en la transferencia que representan especies de tri, penta y octaubiquitina contaminantes en la preparación de tetraubiquitina con enlaces K48. Apu2.11-apu2.20 reconocieron específicamente tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y no reconocieron diubiquitina con enlaces K48 inmovilizada (véase Figura 20B).

5 EJEMPLO 3: UNIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-POLIUBIQUITINA CON PROTEÍNAS POLIUBIQUITINADAS DE FORMA ENDÓGENA

Experimentos previos han demostrado que la actividad de la Proteína de Interacción con el Receptor (RIP), un mediador esencial de 140 kD del complejo de señalización del receptor TNF 1 (TNFR1) próximo, se modula por poliubiquitinación (Wertz *et al.*, Nature 430: 694-699 (2004)). Cuando RIP está poliubiquitinada con cadenas de poliubiquitina con enlaces K63, se facilita la señalización a través de TNFR1. La retirada de las cadenas de poliubiquitina con enlaces K63 de RIP por la desubiquitinación N terminal de A20 y reemplazo con cadenas de poliubiquitina con enlaces K48 por la función de ubiquitina ligasa del extremo C terminal A20 inactiva RIP y la marca como objetivo para la degradación proteosómica. Ese mecanismo se ha dilucidado usando líneas celulares que expresaban ubiquitina mutante capaz de formar solamente poliubiquitina con enlaces K48 o con enlaces K63.

Se evaluó la capacidad de dos de las proteínas de unión anti-poliubiquitina con enlaces K48 y anti-poliubiquitina con enlaces K63 de la invención para reconocer específicamente las formas poliubiquitinadas de forma diferente de RIP que existen en células HeLa S3 en diferentes puntos temporales después de tratamiento con TNF. Se trataron cuatro litros de células HeLa S3 a aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml con MG-132 21 μ M. Inmediatamente después del tratamiento, se retiró un litro de las células del cultivo principal, se recogieron por centrifugación, se lavaron con 200 ml de PBS y se volvieron a centrifugar. Esta muestra se usó como el punto temporal de tiempo cero. Los tres litros restantes de cultivo celular se trataron con TNF 100 ng/ml. Se retiró un litro de células, se recogió, se lavó con 200 ml de PBS, se volvió a centrifugar a cada uno de 5, 15 y 25 minutos de tratamiento con TNF. Las células de cada punto temporal se lisaron en 30 ml de tampón de lisis IP (LB) (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton x-100 1 %, EDTA 1 mM, MG-132 25 μ M, NEM 10 mM, 30 μ l de cada uno de los cócteles inhibidores de fosfatasa 1 y 2 (Sigma) y un comprimido inhibidor de proteasa Complete (Roche)) y se incubaron con rotación a 4 °C durante 20-60 minutos. Cada lisado se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml y se sedimentó dos veces durante cinco minutos a 10.000 x g. La concentración de proteína del lisado de cada punto temporal se estimó. Cada lisado (30 ml para cada punto temporal con concentraciones de proteínas normalizadas) se incubó durante 1,25-1,5 horas con 1 ml de perlas de Proteína A/G desbloqueadas a 4 °C. Las perlas y los residuos se separaron del lisado por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Se tomó una muestra de cada lisado para dirigir el análisis de transferencia de Western, y el volumen restante se congeló a -80 °C.

Se tomaron cuatro muestras de 16 ml de cada lisado. A cada muestra se añadió MG-132 25 mM y 20 μ l de NEM. Se combinaron dos muestras cada una con 2,4 μ g/ml de un anticuerpo anti-TNFR1. Se combinaron otras dos muestras cada una con 2,4 μ g/ml de un anticuerpo de control (anti-myc). Todas las muestras se incubaron durante dos horas a 4 °C con rotación, seguido de la adición de 150 μ l de una suspensión al 50 % de perlas de proteína A desbloqueadas. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 5 horas adicionales con rotación. Las muestras se sedimentaron por centrifugación, y las perlas se lavaron una vez con 15 ml de LB, dos veces con 10 ml de LB que contenía NaCl 1 M, y dos veces con 10 ml de LB. Las perlas lavadas se resuspendieron en 1,25 ml de LB y se transfirieron a tubos de microcentrifuga. Cada muestra se aspiró de modo que el tubo contenía un volumen total de 950 μ l, y se añadieron 360 mg de urea sólida a cada muestra para una concentración final en cada muestra de 6 M en urea. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Las perlas de cada muestra se sedimentaron por centrifugación. Se reservó una parte de cada sobrenadante para análisis por transferencia de Western, y el sobrenadante restante de cada muestra (aproximadamente 1 ml por muestra) se diluyó a 10 ml con tampón de dilución de disociación (Triton-X100 1 %, desoxicolato 0,5 %, NaCl 120 mM, HEPES 50 mM, pH 7,2 y cóctel de inhibidor de proteasa Complete (Roche)).

Cada muestra se dividió en dos porciones de cinco ml. Una porción se trató con 2,5 μ g de apu2.16 que se había cambiado de formato de la forma fab a la forma IgG, y la otra se trató con 2,5 μ g de apu2.07 que se había cambiado de formato de la forma fab a la forma IgG. A ambas muestras se añadieron 50 μ l de perlas de proteína A, y las muestras se incubaron durante 5 horas a 4 °C. Las perlas de proteína A se sedimentaron y se lavaron tres veces en TNFR1 LB, que se había transferido a tubos de microcentrifuga durante el proceso de lavado. Se añadió tampón de muestra a todas las muestras, y cada muestra (incluyendo las muestras previamente reservadas para análisis de transferencia de Western) se redujo y se procesó en geles Novex® de 10 pocillos de 1,5 mm de tris/gly al 10 % (Invitrogen). Después de procesarlas, las proteínas de los geles se transfirieron a membranas de PVDF Invitrolon™ (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas se bloquearon con PBS-T al 5 % y se exploraron con un anticuerpo monoclonal anti-RIP (Becton Dickinson) durante una noche a temperatura ambiente. Las manchas de transferencia se lavaron después, se exploraron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con HRP (Cappel), se lavaron, se expusieron al reactivo para activar la quimioluminiscencia y se expusieron a película. Los resultados se muestran en las Figuras 21A y 21B. La Figura 21A representa la mancha de transferencia que contiene las muestras inmunoprecipitadas en primer lugar con TNFR1 o anti-myc y después inmunoprecipitadas con el IgG apu2.16 (selectivo de poliubiquitina con enlaces K63). Como se muestra en la Figura 21A, RIP no es visible en las muestras de control anti-myc ni en la muestra de tiempo cero. La banda de RIP fue

más fuerte en la muestra de 5 minutos, y después se redujo significativamente en las muestras de 15 y 25 minutos. La Figura 21B representa la mancha de transferencia que contiene las muestras inmunoprecipitadas en primer lugar con TNFR1 o anti-myc y después inmunoprecipitadas con el IgG apu2.07 (selectivo de poliubiquitina con enlaces K48). Como se muestra en la Figura 21B, no se observó RIP en los carriles de control anti-myc. Los niveles de RIP en esta mancha de transferencia aumentaron a lo largo del tiempo, y fueron más fuertes en la muestra del punto temporal de 25 minutos. Este dato se correlaciona con los hallazgos anteriores de que tras la señalización a través del TNFR1, RIP se poliubiquitina con enlaces K63 en primer lugar, y después se desubiquitina posteriormente y se poliubiquitina con enlaces K48 por A20. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención fueron capaces de unirse específicamente con y diferenciar entre un polipéptido poliubiquitinado con enlaces K63 y un polipéptido poliubiquitinado con enlaces K48 que se había poliubiquitinado en células.

EJEMPLO 4: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-POLIUBIQUITINA DE TERCERA GENERACIÓN

Se construyeron bibliotecas de tercera generación para presentación de Fab a partir del fagémido que codificaba el clon previamente identificado apu2.16 (selectivo para poliubiquitina con enlaces K63) (véase Ejemplo 2 y Figuras 17A y 17B). Se usaron fagos de ese clon para infectar células CJ236 para preparar un molde de ADN de Kunkel. Ese molde se mutó posteriormente para insertar codones de terminación, y se usaron los moldes que contenían terminación en construcción de bibliotecas de la siguiente manera.

El Fab apu2.16 se mutó de acuerdo con tres esquemas diferentes para crear tres bibliotecas derivadas de apu2.16 diferentes. En la primera biblioteca, se mutaron HVR-H1 y HVR-2. HVR-H1 se mutó para incluir un codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una metodología de mutagénesis que utiliza un oligonucleótido mutagénico. La secuencia del oligonucleótido que codifica el codón de terminación fue: GCAGCTTCTGGCTTCAACTAATAACACTGGGTGCGTCAGG (SEC ID N°: 371). El oligonucleótido mutagénico permitió que la isoleucina en la posición 29 se seleccionara de fenilalanina, leucina, isoleucina y valina; que la isoleucina en la posición 34 se seleccionara de metionina e isoleucina usando el conjunto de codones mixto NNS (en el que N corresponde a G, C, A o T y S corresponde a G o C); y la distribución al azar suave de los aminoácidos K30, T31, G32 y L33. La distribución al azar suave en este contexto indicó que ciertas posiciones de nucleótidos estaban el 70 % del tiempo ocupadas por la base indicada y el 10 % del tiempo ocupadas por una de los tres bases. Para los oligonucleótidos a continuación, en los que se incluyó dicha distribución al azar suave en una base particular, la presencia de la distribución al azar suave se indica por la presencia de un número en esa posición de base. El número "5" indica que la base de adenina estaba presente el 70 % del tiempo en esa posición, mientras que las bases guanina, citosina y timina estaban cada una presentes el 10 % del tiempo. De forma similar, el número "6" se refiere a guanina, "7" a citosina y "8" a timina, en las que en cada caso, cada una de las otras tres bases estaba presente solamente el 10 % del tiempo. La secuencia oligonucleotídica usada para mutar apu3.16 HVR-H1 fue: GCAGCTTCTGGCTTCAACNTC556577668788ATSCACTGGGTGCGTCAGG (SEC ID N°: 785).

HVR-H2 también se modificó para incluir un codón de terminación en el molde de Kunkel, seguido de una mutagénesis utilizando tres oligonucleótidos mutagénicos. El oligonucleótido que codificaba el codón de terminación en todos los casos fue: GGCCTGGAATGGGTTGCATAATAATATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID N°: 373). Los tres oligonucleótidos mutagénicos fueron dos permutaciones de una primera secuencia deseada, y una segunda secuencia deseada. La primera secuencia deseada incluyó: un resto de tirosina fijo y uno distribuido al azar en una de las posiciones 50 y 54 usando el conjunto de codones mixto NNS (descrito anteriormente); restos fijos en las posiciones 51 (isoleucina), 52a (prolina), 53 (tirosina), 55 (glicina) y 57 (treonina); y distribución al azar suave de las posiciones S52, S56 y S58 (de acuerdo con el esquema de distribución al azar suave descrito anteriormente). La segunda secuencia deseada incluyó: restos fijos en las posiciones 51 (isoleucina), 52a (prolina), 53 (tirosina), 55 (glicina) y 57 (treonina); distribución al azar dura de las tirosinas en las posiciones 50 y 54 usando el conjunto de codones mixto NNS (descrito anteriormente) y distribución al azar suave de las posiciones S52, S56 y S58 (de acuerdo con el esquema de distribución al azar suave descrito anteriormente). Los oligonucleótidos usados para mutar apu2.16 HVR-H2 fueron GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATC567CCGTACTACGGT567ACC567TATGCCGATAGCGT CAAGG (SEC ID N°: 786), GGCCTGGAATGGGTTGCATACATC567CCGTACNNSGGT567 ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID N°: 787) y GGCCTGGAATGGGTTGCANNSATC567CCGTACNNSGGT567ACC567TATGCCGATAGCGTCAAGG (SEC ID N°: 788). En la segunda biblioteca de apu2.16, se mutaron HVR-H2 y HVR-H3. HVR-H2 se mutó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H2 en la primera biblioteca de apu2.16, usando el mismo oligonucleótido que contiene codón de terminación y los mismos tres oligonucleótidos mutagénicos. HVR-H3 se mutó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H3 en la primera biblioteca de apu 18 (descrita en el Ejemplo 2), usando el mismo oligonucleótido que contiene codón de terminación y los mismos seis oligonucleótidos mutagénicos.

En la tercera biblioteca de apu2.16, se mutaron HVR-H1 y HVR-H3. HVR-H1 se mutó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H1 en la primera biblioteca de apu2.16, usando el mismo oligonucleótido que contiene codón de terminación y oligonucleótido mutagénico. HVR-H3 se mutó de forma idéntica a las modificaciones realizadas a HVR-H3 en la primera biblioteca de apu18 (descrita en el Ejemplo 2), usando el mismo oligonucleótido que contiene codón de terminación y los mismos seis oligonucleótidos mutagénicos.

Las reacciones de mutagénesis para cada una de las tres bibliotecas derivadas de apu2.16 se transformaron en *E. coli* XL-1 electrocompetente por electroporación. Se permitió que las células se recuperaran durante 30 minutos a 37 °C con agitación en medio SOC. Se reservaron veinte microlitros del medio SOC que contenía células para determinar el número de transformantes, y el resto se transfirió después a 500 ml de 2YT que contenía carbenicilina y 10¹⁰ fagos auxiliares M13K07 por mililitro. Después de 45 minutos de incubación a 37 °C con agitación, el caldo de cultivo se complementó con kanamicina y se dejó crecer durante una noche a 37 °C con agitación. El número de transformantes para cada biblioteca fue de >10⁹. Los fagos se recogieron y se concentraron a partir del caldo de cultivo por centrifugación y precipitación con PEG y se usaron en ciclos posteriores de selección.

Las tres bibliotecas de tercera generación se clasificaron cada una por separado frente a poliubiquitina con enlaces K63 inmovilizada en placas Maxisorp (NUNC) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo (1A). La rigurosidad se moduló de tres maneras: por la concentración de poliubiquitina biotinilada; por la adición de poliubiquitina no biotinilada en exceso para competir por la unión antes de la captura en pocillos recubiertos con neutravidina; y por la duración de la competición. Cada ciclo de clasificación en solución incluyó monoubiquitina 3 µM y poliubiquitina con enlaces K48 30 µg/ml en el tampón de clasificación durante la etapa de incubación. Los fagos eluidos se amplificaron y se agruparon para ciclos adicionales de clasificación. Los ciclos de selección posteriores fueron clasificados en fase de solución. El primer ciclo de clasificación en solución incluyó poliubiquitina biotinilada (Sulfo-NHS-biotina, Pierce) 100 nM incubada con los grupos de fagos durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó después diez veces en tampón de clasificación en solución (PBST con Superblock 0,5 % (Pierce)) y se capturó usando pocillos recubiertos con neutravidina durante cinco minutos. Una reacción que contenía cadenas de poliubiquitina no biotiniladas actuó como un control para monitorizar la unión de fagos de fondo. Las placas se lavaron con PBST y se eluyeron con HCl 0,1 M durante 10 minutos. Para el segundo ciclo de clasificación en solución, los fagos se equilibraron con poliubiquitina biotinilada 30 nM, como en el ciclo uno, pero se diluyeron diez veces en tampón de clasificación en solución que contenía poliubiquitina no biotinilada 30 µl/ml (con enlaces K63) durante cinco minutos de selección de velocidad de disociación seguido de captura en pocillos recubiertos con neutravidina.

Después del primer ciclo de clasificación en solución, se observó un enriquecimiento 6,5 veces para las bibliotecas combinadas basadas en apu2.16 (véase Tabla E). Se obtuvo un enriquecimiento 10 veces adicional después de la segunda clasificación en solución para la velocidad de disociación lenta (véase Tabla E).

Tabla E: Resultados de la clasificación en solución de biblioteca de anticuerpos anti-poliubiquitina de tercera generación

Biblioteca	Clasificación en placa		Clasificación en solución			
	Ciclo 1		Ciclo 2 (100 nM)		Ciclo 3 (30 nM)	
	Tamaño de la biblioteca	Enriquecimiento	Tamaño de la biblioteca	Enriquecimiento	Tamaño de la biblioteca	Enriquecimiento
16-1	1,06e+06	ND	1,04e+05	6,5	1,00e+05	10
16-2	5,98e+05	ND				
16-3	1,76e+05	ND				

Después de un ciclo de clasificación en placa y dos ciclos de clasificación en solución, los clones individuales seleccionados de la tercera generación se cultivaron en un formato de 96 pocillos y se exploraron por ELISA de fagos como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2. Se identificaron setenta y dos clones únicos por secuenciación. De esos clones, doce demostraron el mayor grado de especificidad por poliubiquitina con enlaces K63 en el ensayo de ELISA de fagos (Figura 22). Esos doce se designaron apu3.01-3.12, y sus secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 aparecen en las Figuras 23A y 23B. El HVR de cadena ligera para uno de los clones específicos de poliubiquitina con enlaces K63 no se secuenció, pero se esperaba que las secuencias de HVR-L1 y HVR-L2 fueran invariantes, mientras que se esperaba que la secuencia de HVR-L3 fuera idéntica a la de apu2.16. La secuencia de HVR-L1 fue RASQSVSSAVA (SEC ID N°: 79) y la secuencia de HVR-L2 fue SASSLYS (SEC ID N°: 80), de acuerdo con el diseño de la biblioteca. Todos los clones tuvieron las mismas secuencias marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera (véase Figura 6).

Apu2.07 (véase Ejemplo 2 y Figuras 16A y 16B) y apu3.07 (véase anteriormente y Figuras 23A y 23B) se expresaron en células CHO o 293 como IgG humanas. Se prepararon construcciones de expresión por mutagénesis de Kunkel de vectores de expresión de mamíferos pRK apropiados que codificaban las cadenas pesada y ligera de IgG humana (Gorman *et al.*, DNA Prot. Eng. Tech. 2: 3-10(1990)). Se purificaron IgG por cromatografía de afinidad usando metodologías convencionales.

La capacidad de cada IgG para unirse específicamente con poliubiquitina del enlace apropiado inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa se evaluó por transferencia de Western. Se procesaron poliubiquitinas y monoubiquitinas con enlaces K48 o K63 (Boston Biochem) en geles de poliacrilamida de Tris-glicina 4-20 % (Invitrogen). Los contenidos de los geles se transfirieron a nitrocelulosa por electrotransferencia. Se bloquearon los sitios de unión no

específica en la membrana de nitrocelulosa durante 1 hora en leche en polvo desnatada desgrasada al 5 % en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 (TBST) al 0,1 %. Después se añadieron anticuerpos específicos de K48 o específicos de K63 a la mancha de transferencia a una concentración de 2 µg/ml (IgG apu 2.07) o 1 µg/ml (IgG apu3.07) y se incubó durante una hora para permitir que se produjera la unión. Como control positivo, se incubó una mancha de transferencia con anticuerpos de conejo anti-ubiquitina (Sigma). Las manchas de transferencia se lavaron en TBST y los anticuerpos unidos se detectaron por Fc anti-Ig humano de cabra conjugado con peroxidasa (ICN) o Ig anti-conejo conjugado con peroxidasa (Amersham) diluido 1:10.000 en TBST que contenía leche en polvo desgrasada al 5 %. Después de una hora, las manchas de transferencia se lavaron en TBST y se revelaron usando el reactivo Super Signal West Dura (Pierce) para revelar la actividad peroxidasa. Los resultados se muestran en las Figuras 24A-24D.

Como se esperaba, el IgG apu2.07 reconocía específicamente la tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada y de tri a heptaubiquitina con enlaces K48 (Figura 24A), pero no se unió con ninguna de las muestras de poliubiquitina con enlaces K63 inmovilizadas. De forma similar, el IgG apu3.07 reconoció específicamente la tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y de tri a heptaubiquitina con enlaces K63 (Figura 24B), pero no se unió con ninguna de las muestras de poliubiquitina con enlaces K48 inmovilizadas. Ningún IgG se unió con monoubiquitina inmovilizada. Para evaluar la sensibilidad de cada IgG, se realizó análisis de transferencia de Western adicional con diversas concentraciones de tetraubiquitina con enlaces K48 y con enlaces K63 inmovilizada (25-1000 ng/carril) (Figuras 24C y 24D). IgG apu2.07 detectó tan poco como 50 ng de tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada, y de nuevo no se unió específicamente con tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada (Figura 24C). IgG apu3.07 detectó tan poco como 50 ng de tetraubiquitina con enlaces K63 inmovilizada y de nuevo no se unió específicamente con tetraubiquitina con enlaces K48 inmovilizada (Figura 24D). En ambos casos, las cantidades aumentadas de tetraubiquitina inmovilizada dieron como resultado unión observada aumentada.

Para determinar las IgG eran capaces de detectar proteínas poliubiquitiniladas de forma endógena, se prepararon lisados proteicos a partir de la línea celular de riñón embrionario humano 293T tratados con o sin 20 µM del inhibidor de proteasoma Velcade® (bortezomib) durante cuatro horas. Los lisados se resolvieron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida de Tris-glicina 4-20 % (Invitrogen), y se realizó transferencia Western como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 25. Un anticuerpo policlonal anti-ubiquitina (SIGMA) detectó un gran número de proteínas de alto peso molecular (carriles más a la izquierda) tanto en presencia como en ausencia del tratamiento con Velcade®. El IgG apu2.07 se unió con numerosas proteínas de diversos pesos moleculares (carriles más a la derecha) y la unión observada fue mayor con los lisados tratados con velcade inmovilizados que con los lisados no tratados inmovilizados. Se observó significativamente menos unión general con el IgG apu3.07 (carriles centrales), que se esperaba que se uniera con proteínas poliubiquitiniladas K63, y no hubo diferencias aparentes en la unión entre los carriles tratados y no tratados con velcade. Se sabe que la poliubiquitinación con enlaces K48 se dirige a proteínas intracelulares para degradación proteolítica (Chau *et al.*, Science 243: 1576-1583 (1989); Finley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 14: 5501-5509 (1994); Flick *et al.*, Nat. Cell. Biol. 6: 634-641 (2004)). Por lo tanto, una explicación para los resultados de IgG apu2.07 fue que cuando se evitó el procesamiento proteolítico, permaneció una cantidad aumentada de proteínas poliubiquitiniladas K48 en el lisado, dando como resultado aumento de la unión por el IgG apu2.07 frente a la muestra no tratada. No se conoce que la poliubiquitinilación con enlaces K63 se dirija a proteínas para degradación (Pickart y Fushman, Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 610-616 (2004); Hicke y Dunn, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 141-172 (2003); Spece *et al.*, Mol. Cell Biol. 15: 1265-1273 (1995); Ulrich, Eukaryot. Cell 1: 1-10 (2002); Spence *et al.*, Cell 102: 67-76 (2000); Seibenhener *et al.*, Mol. Cell. Biol. 24(18): 8055-8068 (2004)). Por lo tanto, una explicación para los resultados de IgG apu 3.07 fue que la inhibición de proteasomas no dio como resultado una acumulación de proteínas poliubiquitiniladas con K63.

EJEMPLO 5: ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA UNIÓN DE FAB CON ANTI-POLIUBIQUITINA CON ENLACES K63

Para entender mejor la interacción del fab anti-poliubiquitina con enlaces K63 con la poliubiquitina, el fab anti-poliubiquitina con enlaces K63 apu2.16 se co-cristalizó con diubiquitina con enlaces K63. Los cristales se dejaron crecer en gotas colgantes usando 1 µl de una solución de apu2.16 (15 mg/ml en Tris 10 mM, NaCl 75 mM, pH 8,0) y 1 µl de solución de pocillo (LiCl 0,1 M, Tris 0,1 M pH 8,2, citrato 1 M). A cada gota se añadieron 0,5 µl de cloruro cúprico 0,1 M y cada gota se sembró en estrías. Los grupos de cristales crecieron durante varios días y pudieron manipularse para obtener un único cristal de difracción. La estructura se determinó por reemplazo molecular. Se recogieron datos nativos a 100 K y se procesaron con HKL2000. Los cristales pertenecían al grupo espacial C2 con dimensiones celulares $a = 177,7 \text{ \AA}$, $b = 94,9 \text{ \AA}$, $c = 97,9 \text{ \AA}$ y $\beta = 107$, con dos complejos en la unidad asimétrica. La estructura se resolvió por reemplazo molecular usando el programa Phaser y las coordenadas de una variante del fragmento fab 4d5 humanizado (PBD para 4d5: PDB código 1FVE). La construcción del modelo se llevó a cabo en el programa Coot y la estructura se refinó con Refmac5. La resolución de la estructura es 3,1 Å. El complejo se ha refinado hasta una R de 24,5 % y una R_{libre} de 30,4 %.

La interacción entre apu2.16 y la de diubiquitina con enlaces K63 se muestra en las Figuras 26A-26C. El epítipo estructural es una combinación de restos que internan al menos el 25 % de su área superficial accesible al disolvente tras la unión con fab y/o tienen más de un átomo a una distancia de 4,5 Å de la cadena pesada o de la

cadena ligera del fab. La cadena de ubiquitina que dona K63 es la cadena A, y la cadena de ubiquitina que dona el extremo C terminal es la cadena B. Los restos de cadena ligera de Fab pertenecen a la cadena L, y los restos de cadena pesada de fab pertenecen a la cadena H. El número de cadena precede al número del resto en la tabla posterior y los restos de fab se numeran secuencialmente.

5

TABLA F: Restos localizados en la interfaz de unión de apu2.16-diubiquitina con enlaces K63

Restos de Ubiquitina	Restos de Fab
A 18 Glu	
A 19 Pro	L 31 Ser
A 20 Ser	L 49 Tvr
A 21 Asp	L 50 Ser
A 55 Thr	L 51 Ala
A 56 Leu	L 52 Ser
A 57 Ser	L 53 Ser
A 58 Asp	L 66 Arg
A 60 Asn	L 98 Phe
A 61 Ile	
A. 62 Gln	H 30 Lys
	H 31 Thr
B 8 Leu	H 32 Gly
B 9 Thr	H 33 Leu
B 34 Glu	H 50 Tyr
B 35 Gly	H 52 Ser
B 36 Ile	H 54 Tyr
B 37 Pro	H 55 Tyr
B 39 Asp	H 99 Glu
B 40 Gln	H 100 Tyr
B 71 Leu	H 101 Tyr
B 72 Arg	H 102 Arg
B 73 Leu	H 104 Tyr
B 74 Arg	H 105 Thr
B 75 Glv	

Como se muestra en la Tabla F y como se indica en la Figura 26B, en gris oscuro, hubo once restos en la cadena A de diubiquitina K63 y trece restos en la cadena B de diubiquitina K63 que se localizaban a una distancia de 4,5 Å de apu2.16 cuando se unieron con apu2.16. Como se muestra en la Tabla F, y como se indica en la Figura 26C en gris oscuro, hubo ocho restos en la cadena ligera de apu2.16 y catorce restos en la cadena pesada de apu2.16 que se localizaron a una distancia de 3,5 Å de diubiquitina con enlaces K63 cuando se unieron con esa molécula. Basándose en estos datos, los restos que probablemente medien en la interacción entre los dos en la diubiquitina con enlaces K63 incluyen Glu-18, Ser-20, Leu-57 y Asp-58 en la cadena A y Pro-37, Arg-74 y Gly-75 en la cadena B. Resulta interesante que el anticuerpo no interacciona íntimamente con el enlace K63-Gly 76 sino que en su lugar deriva la especificidad mediante interacciones de la superficie del complejo de di-ubiquitina contiguo al enlace.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIRECCIÓN DE POLIUBIQUITINA

<130> P2260R1-PCT

<140>

<141>

<150> 60/751.081

<151> 15-12-2005

<150> 60/793.980
 <151> 21-04-2006
 <160> 908
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 1
 Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Met His
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 2
 Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 3
 Gly Phe Asn Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile His
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 4
 Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Tyr Tyr Ile His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT

	<213> Secuencia artificial
	<220>
5	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 5
	Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Tyr Met His
	1 5 10
10	<210> 6
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 6
	Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Tyr Met His
20	1 5 10
	<210> 7
	<211> 10
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
30	<400> 7
	Gly Phe Asn Leu Tyr Tyr Ser Tyr Met His
	1 5 10
35	<210> 8
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 8
	Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
45	1 5 10
	<210> 9
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
50	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 9
55	Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Tyr Met His
	1 5 10

	<210> 10																					
	<211> 10																					
	<212> PRT																					
5	<213> Secuencia artificial																					
	<220>																					
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético																					
	<400> 10																					
10		<table border="0"> <tr> <td>Gly</td><td>Phe</td><td>Asn</td><td>Val</td><td>Tyr</td><td>Tyr</td><td>Ser</td><td>Ser</td><td>Ile</td><td>His</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td> </tr> </table>	Gly	Phe	Asn	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ile	His	1				5					10
Gly	Phe	Asn	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ile	His													
1				5					10													
	<210> 11																					
	<211> 10																					
15	<212> PRT																					
	<213> Secuencia artificial																					
	<220>																					
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético																					
20	<400> 11																					
		<table border="0"> <tr> <td>Gly</td><td>Phe</td><td>Asn</td><td>Val</td><td>Ser</td><td>Tyr</td><td>Ser</td><td>Tyr</td><td>Met</td><td>His</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td> </tr> </table>	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	1				5					10
Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Tyr	Ser	Tyr	Met	His													
1				5					10													
25	<210> 12																					
	<211> 10																					
	<212> PRT																					
	<213> Secuencia artificial																					
30	<220>																					
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético																					
	<400> 12																					
35		<table border="0"> <tr> <td>Gly</td><td>Phe</td><td>Asn</td><td>Leu</td><td>Tyr</td><td>Tyr</td><td>Ser</td><td>Tyr</td><td>Met</td><td>His</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td> </tr> </table>	Gly	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His	1				5					10
Gly	Phe	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Met	His													
1				5					10													
	<210> 13																					
	<211> 10																					
40	<212> PRT																					
	<213> Secuencia artificial																					
	<220>																					
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético																					
45	<400> 13																					
		<table border="0"> <tr> <td>Gly</td><td>Phe</td><td>Asn</td><td>Val</td><td>Tyr</td><td>Tyr</td><td>Ser</td><td>Ser</td><td>Ile</td><td>His</td> </tr> <tr> <td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td> </tr> </table>	Gly	Phe	Asn	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ile	His	1				5					10
Gly	Phe	Asn	Val	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Ile	His													
1				5					10													
50	<210> 14																					
	<211> 10																					
	<212> PRT																					
	<213> Secuencia artificial																					
	<220>																					
55	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético																					
	<400> 14																					

		Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
		1 5 10
5	<210> 15	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 15	
		Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
		1 5 10
15	<210> 16	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 16	
		Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Tyr Tyr Ile His
25		1 5 10
	<210> 17	
	<211> 10	
30	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 17	
		Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Ile His
		1 5 10
40	<210> 18	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 18	
		Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Met His
		1 5 10
50	<210> 19	
	<211> 10	
	<212> PRT	
55	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 19

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

10 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 20

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

20 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 21

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

30 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 22

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

45 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 23

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

55 <210> 24

	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 24
10	Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His 1 5 10
	<210> 25
	<211> 10
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
20	<400> 25
	Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Met His 1 5 10
25	<210> 26
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (4) .. (4)
35	<223> Leu, Val, Ile o Phe
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (5) .. (8)
40	<223> Ser o Tyr
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (9) .. (9)
45	<223> Met o Ile
	<400> 26
50	Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His 1 5 10
	<210> 27
	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
55	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 27
60	

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 28

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 29

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 30

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 31

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 32

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15
 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 33

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 34

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35

5

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 36

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 37

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 38

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39

45

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 39

Ser	Ile	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

10

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 40

20

Ser	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 41

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 41

30

Ser	Ile	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 42

40

Ser	Ile	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

45

5
 <210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 43

10
 Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

15
 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 44

20
 Ser Ile Tyr Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

25
 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 45

30
 Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

35
 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 46

40
 <210> 46
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 46

45

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 47

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 48

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 49

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 50

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 51

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 52

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3) .. (3)

30 <223> Tyr o Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

35 <223> Pro o Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (6)

40 <223> Tyr o Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7) .. (7)

45 <223> Ser o Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

50 <223> Tyr o Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

55 <223> Ser o Tyr

<400> 52

Ser Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 53

Gly Tyr Glu Gly Gly Met Ala Met Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 54

Asp Gly Tyr Ala Met Asp Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 55

Leu Tyr His Asn Thr Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 56

50 **Pro Tyr Ser Tyr Ser Glu Ala Met Asp Tyr**
1 5 10

<210> 57
 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 57

Glu	Tyr	Tyr	Met	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Tyr
1				5					10

10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 58

20

Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Ile	Ser	Ala	Ile	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 59

<211> 10

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 59

Ser	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ala	Leu	Asp	Tyr
1				5					10

35

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60

Gly	Tyr	Lys	Tyr	Trp	Ser	Ala	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

45

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

<400> 61

Ser Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 62
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 62

Glu Gly Tyr Ser Gln Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

15

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 63

Ser Tyr Gly Tyr Tyr Val Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 64

Asp Tyr Lys Phe Gly Tyr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40

<210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 65

Glu Gly Tyr Ser Gln Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

50

<210> 66
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66

5

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 67

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 67

Gly Tyr Met Trp Tyr Gly Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 68

Glu Tyr Tyr Ser Tyr Leu Gly Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 69

His Thr Lys Tyr Val Tyr Leu Tyr Thr Tyr Trp Glu Asp Ser Met Asp
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Asp Tyr
20

45

<210> 70

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70

Ser Ser Ile Ser Glu Trp Tyr Gly Ser Trp Tyr Tyr Phe Trp Glu Ser
1 5 10 15

Ser Gly Ile Asp Tyr
20

5 <210> 71
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 71

Glu Ser Tyr Trp Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 72

Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 73

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 74
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 74

Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

50

5 <210> 75
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 75

 Gly Tyr Ile His Trp Glu Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

 15 <210> 76
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 76

 Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

 25 <210> 77
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 77

 Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
 1 5 10
 35

 40 <210> 78
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Gly, Asp, Leu, Pro, Glu, Ser o His

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Tyr, Gly, Thr o Ser

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Glu, Tyr, His, Ser, Lys, Gly, Met o Ile

 60 <220>

	<221> MOD_RES
	<222> (4) .. (4)
	<223> Gly, Ala, Asn, Tyr, Met, Ser, Phe, Trp o His
5	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (5) .. (5)
	<223> Gly, Met, Thr, Ser, Tyr, Ile, Trp, Gln, Val o Glu
10	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (6) .. (6)
	<223> Met, Asp, Leu, Glu, Ser, Gly, Val, Tyr o Trp
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (7) .. (7)
	<223> Ala, Gly, Leu o Tyr
20	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8) .. (8)
	<223> Met, Leu, Ile, Phe, Ala, Tyr o Gly
25	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (9) .. (9)
	<223> Ile, Thr, Ser o no presente
30	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (10)..(11)
	<223> Tyr, Trp o no presente
35	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (12)..(12)
	<223> Glu, Tyr o no presente
40	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (13)..(13)
	<223> Asp, Phe o no presente
45	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (14) .. (14)
	<223> Ser, Trp o no presente
50	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (15)..(15)
	<223> Met, Glu o no presente
55	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (16)..(16)
	<223> Asp, Ser o no presente
60	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (17)..(17)
	<223> Tyr, Ser o no presente
65	<220>
	<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)
 <223> Este resto puede estar o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19) .. (19)
 <223> Leu, Ile o no presente

<400> 78

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Asp Tyr
20

<210> 79
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 80

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

<210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 81

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 82
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 82

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<213> Secuencia artificial

15

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<213> Secuencia artificial

<400> 84

Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<213> Secuencia artificial

40

<400> 85

Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

<213> Secuencia artificial

<400> 86

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Ser Ile His
1 5 10

87

5
 <210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 87

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

15
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 88

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

25
 <210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 89

Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

35
 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ile, Phe, Leu o Val

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(8)
 <223> Ser o Tyr

55
 <400> 90

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile His
1 5 10

5
 <210> 91
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15
 <400> 91

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20
 <210> 92
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30
 <400> 92

Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35
 <210> 93
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45
 <400> 93

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

50
 <210> 94
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60
 <400> 94

Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 95
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 95

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 96

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 97
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 97

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 98
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 98

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 99

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 100
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Tyr o Ser

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Ser o Tyr

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro o Ser

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Tyr o Ser

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gly o Ser

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ser o Tyr

```
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ser o Tyr
```

$\langle 400 \rangle$ 100

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 101
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 101

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 102
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 102

Glu Lys Met Tyr Tyr Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 103
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 103

Glu Ser Tyr Ser Ile His Phe Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 104
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 104

Met Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Trp Arg Pro Tyr Gly Asn Ala Ile Asp Tyr
1 5 10 15

5 <210> 105
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 105

Gly Ser Ile Pro Ser Tyr Trp Ser Ala Asp Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

15 **Leu Asp Tyr**

<210> 106
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 106

Tyr Lys Tyr Asn Tyr Tyr Tyr Phe Glu Ser Gly Met Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 107
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 107

Glu Tyr Tyr Trp Trp Tyr Lys Glu Ala Trp Tyr Ser Ala Gly Met Asp
1 5 10 15

Tyr

40 <210> 108
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 108

Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
1 5 10 15

Leu Asp Tyr

5 <210> 109
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 109

Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gln Gly Tyr Trp Trp Tyr Tyr Tyr Thr Gly Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Tyr
20

15 <210> 110
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Glu, Met, Gly, Tyr o Ser
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr, Lys, Ser, Ile o Gly
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr, Met o Ile
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Arg, Tyr, Ser, Pro, Asn, Trp o Phe
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trp, Tyr, Ile o Ser
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Tyr, Ser, His o Gln
 <220>
 <221> MOD_RES

	<222> (7)..(7)
	<223> Thr, Tyr, Phe, Trp, Lys o Gly
5	<220> <221> MOD_RES <222> (8)..(8) <223> Ala, Gly, Arg, Ser, Phe, Glu, Trp o Tyr
10	<220> <221> MOD_RES <222> (9)..(9) <223> Ile, Phe, Pro, Ala, Glu o Trp
15	<220> <221> MOD_RES <222> (10)..(10) <223> Tyr, Asp, Ser, Trp o no presente
20	<220> <221> MOD_RES <222> (11)..(11) <223> Gly, Trp, Tyr o no presente
25	<220> <221> MOD_RES <222> (12)..(12) <223> Asn, Tyr, Met, Ser, Asp o no presente
30	<220> <221> MOD_RES <222> (13)..(13) <223> Ala, Tyr o no presente
35	<220> <221> MOD_RES <222> (14)..(14) <223> Ile, Tyr, Gly, Ser, Thr o no presente
40	<220> <221> MOD_RES <222> (15)..(15) <223> Tyr, Met, Asp, Gly o no presente
45	<220> <221> MOD_RES <222> (16)..(16) <223> Gly, Ala, Tyr o no presente
50	<220> <221> MOD_RES <222> (17)..(17) <223> Leu, Tyr o no presente
55	<220> <221> MOD_RES <222> (18)..(18) <223> Este resto puede estar o no presente
60	<220> <221> MOD_RES <222> (19)..(19) <223> Este resto puede estar o no presente
65	<400> 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Met Asp Tyr
20

5
<210> 111
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 111

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

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

15
<210> 112
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 112

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

20
<210> 113
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25
<400> 113

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

30
<210> 114
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35
<400> 114

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 115
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 115

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

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

<210> 116
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 116

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 117
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 118
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 119

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 119

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

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

<210> 120

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 121

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 121

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 122

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 122

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

5
<210> 123
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 123

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

15
<210> 124
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 124

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

20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 125
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25
<400> 125

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

30
<210> 126
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
35
<400> 126

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 127
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 127

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 128
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 128

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 129
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 129

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 130
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 131
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 132
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 133
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 134
<211> 23
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 135
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 136
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 136

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 , 25 30

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 137

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 138
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 138

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 139
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 139

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 1 5 10

<210> 140
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 141
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 142
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 143
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 144
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 144

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 145
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 145

Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 146
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 146

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 147
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 147

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 148
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 148

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 149
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 149

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 150
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 150

tcttgtgaca aaactcacca tcaccatcac catcactagg gcggtgggtc tggttccggt 60
gatttt 66

15 <210> 151
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 151

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

30 <210> 152
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 152

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

40 <210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 153

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Tyr Ser Met His
1 5 10

<210> 154
 <211> 10

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 154

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 155
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 155

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 156
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 156

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 157

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 158
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 158

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

5
 <210> 159
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 159

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

15
 <210> 160
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 160

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

25
 <210> 161
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 161

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

40
 <210> 162
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 162

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

50
 <210> 163
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 163

5

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 164

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

20

<210> 165
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 165

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

30

<210> 166
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 166

Gly Phe Asn Leu Tyr Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

45

<210> 167
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 167

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 168
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 168

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 169
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 169

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 170
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 170

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 171

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

<210> 172
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 172

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

5
 <210> 173
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 173

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

15
 <210> 174
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 174

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

25
 <210> 175
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 175

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

40
 <210> 176
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Val, Phe, Leu o Ile

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Tyr o Ser

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Ser o Tyr

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ile o Met

 <400> 176

 Gly Phe Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10

 15 <210> 177
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 177

 Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 25 Gly

 <210> 178
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 35 <400> 178

 Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

 1 5 10 15

 Gly

 <210> 179
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 179

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 180
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 180

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 181
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 181

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 182
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 182

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 183
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 183

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5

Gly

<210> 184

<211> 17

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 184

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 185

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 185

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

30

<210> 186

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 186

40

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 187

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 187

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 188
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 188

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 189
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 189

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 190
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 190

45

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 191
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 191

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 192
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 192

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 193
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 193

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 194
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 194

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 195

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 195

Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 196

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 196

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 197

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 197

40 **Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 198

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 198

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 199

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 199

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

20

<210> 200

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 200

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 201

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 201

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 202
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Ser o Tyr
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro o Ser
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Tyr o Ser
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser o Gly
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Tyr o Ser
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Ser o Tyr
 40
 <400> 202
 Ser Ile Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 45
 <210> 203
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 203
 Glu Gly Tyr Ser Gln Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 55
 <210> 204
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 204

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 205
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 205

Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 206
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 206

30 <210> 207
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 207

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 208
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 208

Gly Tyr Lys Tyr Trp Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 209

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 209

Glu Ser Phe Tyr Tyr Ser Pro Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

10

<210> 210
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 210

20

Glu Tyr Tyr Ser Tyr Leu Gly Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

25

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

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 211

Gly Tyr Glu Gly Gly Met Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

35

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

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 212

45

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

50

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

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

<400> 213

Gly Tyr Met Trp Tyr Gly Gly Ile Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 214
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Aminoácido variable
 <400> 214

Asp Cys Tyr Tyr Xaa Ala Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 215
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 215

Glu Asn Tyr Trp Trp Ala Ile Asp Tyr
1 5

30 <210> 216
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40 <400> 216

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 217
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 217

Asp Tyr Tyr Phe Phe Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 218

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 218

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

10

<210> 219
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 219

20

Glu Gly Tyr Ile Ser Gly Asp Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

25

<210> 220
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 220

Ser Tyr Ser Ser Tyr Ser Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

35

<210> 221
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 221

45

Gly Tyr Phe Glu Gly Trp Tyr Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

50

<210> 222
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 222

		Glu Tyr Ser Tyr Tyr Gly Gly Phe Asp Tyr 1 5 10
5	<210> 223 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 223	
15		Glu Ser Tyr Trp Ser Tyr Ala Met Asp Tyr 1 5 10
20	<210> 224 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 224	
25		Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr 1 5 10
30	<210> 225 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 225	
40		Tyr Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Asp Tyr 1 5 10
45	<210> 226 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 226	
50		Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr 1 5 10
55	<210> 227 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 227

	Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
5	1 5 10
	<210> 228
	<211> 11
	<212> PRT
10	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> Glu, Ser, Gly, Asp o Tyr
20	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (2)..(2)
	<223> Gly, Tyr, Ser, Cys o Asn
25	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (3)..(3)
	<223> Tyr, Ser, Lys, Phe, Glu o Met
30	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (4)..(4)
	<223> Ser, Tyr, Gly, Trp, Phe, Ile o Glu
35	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (5)..(5)
	<223> Aminoácido variable
40	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (6)..(6)
	<223> Gly, Ser, Tyr, Leu, Met, Gly, Ala o Trp
45	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (7)..(7)
	<223> Gly, Ala, Pro, Ile, Asp o Tyr
50	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8)..(8)
	<223> Phe, Ile, Met, Ala, Leu, Gly o no presente
55	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (9)..(9)
	<223> Phe, Ile, Leu o no presente
60	<400> 228
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
	1 5 10

	<210> 229	
	<211> 10	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 229	
10		Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
		1 5 10
	<210> 230	
	<211> 10	
15	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
20	<400> 230	
		Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Ile His
		1 5 10
	<210> 231	
25	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 231	
		Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Ser Ile His
35		1 5 10
	<210> 232	
	<211> 10	
40	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
45	<400> 232	
		Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Ser Ile His
		1 5 10
	<210> 233	
50	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 233	

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

5
 <210> 234
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 234

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

15
 <210> 235
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 235

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Tyr Ile His
1 5 10

25
 <210> 236
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 236

Gly Phe Asn Val Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

40
 <210> 237
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 237

Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

50
 <210> 238
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 238

Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 239
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 239

Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

20 <210> 240
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ile, Val o Phe

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(8)
 <223> Ser o Tyr

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Ile o Met

<400> 240

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

45

<210> 241
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 241

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 242
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 242

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 243
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 243

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 244
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 244

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 245
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 245

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 246

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 246

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 247

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 247

Tyr Ile Ser Pro Ser Tyr Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 248

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 248

40 **Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 249

45 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 249

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 250

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 250

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 251

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 251

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 252

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

45

<223> Tyr o Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

50

<223> Ser o Tyr

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro o Ser

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Tyr o Ser

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gly o Ser

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Ser o Tyr

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Ser o Tyr

<400> 252

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 253
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 253

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 254
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 254

Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gln Gly Tyr Trp Trp Tyr Tyr Tyr Thr Gly Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Met Asp Tyr
20

5
 <210> 255
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 255

Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
1 5 10 15

Leu Asp Tyr

15
 <210> 256
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 256

Gly Ser Ile Pro Ser Tyr Trp Ser Ala Asp Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Asp Tyr

25
 <210> 257
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 257

Glu Tyr Tyr Trp Trp Tyr Lys Glu Ala Trp Tyr Ser Ala Gly Met Asp
1 5 10 15

Tyr

40
 <210> 258
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 258

Trp Gln Gly Tyr Gly Phe Lys Tyr Tyr Trp Ser Tyr Tyr Val Ser Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Leu Asp Tyr
20

5

<210> 259

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 259

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 260

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 260

Glu Ser Tyr Ala Gly Val Pro Pro Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 261

<211> 19

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 261

40

Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
1 5 10 15

Leu Asp Tyr

<210> 262

45 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 262

Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
 1 5 10 15

Leu Asp Tyr

5 <210> 263
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 263

Glu Tyr Tyr Trp Trp Tyr Lys Glu Ala Trp Tyr Ser Ala Gly Met Asp
 1 5 10 15

Tyr

15
 <210> 264
 <211> 21
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Glu, Ser, Gly o Trp

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr, Gly, Ile, Ser o Gln

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr, Met, Ile, Gly o Ser

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Arg, Tyr, Phe, Pro o Trp

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trp, Tyr, Ser o Gly

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Tyr, Gln, Ser, Phe o Val

55 <220>

	<221> MOD_RES
	<222> (7)..(7)
	<223> Thr, Gly, Trp, Lys, Tyr o Pro
5	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8)..(8)
	<223> Ala, Tyr, Trp, Ser, Glu o Pro
10	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (9)..(9)
	<223> Ile, Trp, Ala, Tyr o Ser
15	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (10).. (10)
	<223> Trp, Tyr, Asp o Gly
20	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (11)..(11)
	<223> Tyr, Trp, Ser, Gly o Phe
25	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (12)..(12)
	<223> Tyr, Asp, Ser, Phe o no presente
30	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (13)..(13)
	<223> Tyr, Ala o no presente
35	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (14)..(14)
	<223> Thr, Ser, Tyr, Gly, Val o no presente
40	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (15)..(15)
	<223> Gly, Asp, Tyr, Met, Ser o no presente
45	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (16)..(16)
	<223> Tyr, Ala, Gly o no presente
50	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (17)..(17)
	<223> Tyr, Leu, Gly o no presente
55	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (18)..(18)
	<223> Este resto puede estar o no presente
60	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (19)..(19)
	<223> Met, Leu o no presente
65	<400> 264

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Asp Tyr
20

5 <210> 265
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 265

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

15 <210> 266
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 266

Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

25 <210> 267
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 267

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Tyr Ser Met His
1 5 10

40 <210> 268
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 268

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

50 <210> 269

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 269

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
 1 5 10

10

<210> 270
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 270

20

Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
 1 5 10

25

<210> 271
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 271

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Tyr Ile His
 1 5 10

35

<210> 272
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 272

45

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Ser Met His
 1 5 10

50

<210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 273

		Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
		1 5 10
5	<210> 274 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 274	
		Gly Phe Asn Val Ser Tyr Ser Ser Ile His
		1 5 10
15	<210> 275 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 275	
		Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Tyr Ile His
		1 5 10
25	<210> 276 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 276	
		Gly Phe Asn Leu Tyr Tyr Ser Tyr Met His
		1 5 10
40	<210> 277 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 277	
		Gly Phe Asn Val Ser Tyr Tyr Ser Ile His
		1 5 10
50	<210> 278 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55		

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 278

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

<210> 279
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 279

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Tyr Ser Ile His
1 5 10

20 <210> 280
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Val, Phe, Leu o Ile

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Tyr o Ser

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (8)
 <223> Ser o Tyr

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met

<400> 280

Gly Phe Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

50

<210> 281
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 281

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 282
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 282

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 283
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 283

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 284
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 284

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 285
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 285

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 Gly

<210> 286

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 286

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 287

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 287

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 288

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 288

40 **Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 289

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 289

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 290

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 290

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 291

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 291

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 292

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 292

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 293
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 293
 10
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 294
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20
 <400> 294
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 295
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 30
 <400> 295
 Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 296
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ser o Tyr
 50
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Pro o Ser

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser o Gly

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Tyr o Ser

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Ser o Tyr

20

<400> 296

Ser Ile Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 297
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 297

Glu Gly Tyr Ser Gln Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 298
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 298

45

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

50

<210> 299
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 299

		Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
5	<210> 300	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 300	
		Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Ile Asp Tyr
		1 5 10
15	<210> 301	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 301	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
25		1 5 10
30	<210> 302	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 302	
		Gly Tyr Lys Tyr Trp Ser Ala Phe Asp Tyr
		1 5 10
40	<210> 303	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 303	
		Glu Ser Phe Tyr Tyr Ser Pro Ala Phe Asp Tyr
50		1 5 10
	<210> 304	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 304

5 **Gly Tyr Glu Gly Gly Met Ala Met Asp Tyr**
 1 5 10

<210> 305

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 305

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 306

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 306

Gly Tyr Met Trp Tyr Gly Gly Ile Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 307

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 307

40 **Glu Asn Tyr Trp Trp Ala Ile Asp Tyr**
 1 5 10

<210> 308

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 308

Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

55 <210> 309

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 309

10

Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 310
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 310

Tyr Tyr Ser Tyr Ser Ser Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 311
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 311

Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 312
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Glu, Ser, Gly o Tyr

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Gly, Tyr, Ser o Asn

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr, Ser, Lys, Phe o Glu
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ser, Tyr, Gly o Trp

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Gln, Tyr, Ser o Gly

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Gly, Ser, Tyr, Met o Ala

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Gly, Ala, Pro o Ile

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Phe, Ile, Met, Ala, Leu o no presente

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Este resto puede estar o no presente

30

<400> 312

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 313
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 313

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
1 5 10

45

<210> 314
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 314

55

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
1 5 10

60

<210> 315
 <211> 11
 <212> PRT

	<213> Secuencia artificial
	<220>
5	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 315
	Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Pro Ile Thr
	1 5 10
10	<210> 316
	<211> 11
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 316
	Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Val Thr
20	1 5 10
	<210> 317
	<211> 10
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
30	<400> 317
	Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
	1 5 10
35	<210> 318
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 318
	Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val Thr
45	1 5 10
	<210> 319
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
50	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 319
55	Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ser Leu Phe Thr
	1 5 10

ES 2 535 856 T3

<210> 320
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 320
 10
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val Thr
 1 5 10
 <210> 321
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20
 <400> 321
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10
 25
 <210> 322
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 322
 Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10
 35
 <210> 323
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 45
 <400> 323
 Gln Gln Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Ile Thr
 1 5 10
 50
 <210> 324
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 324

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Val Thr
1 5 10

5 <210> 325
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 325

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Tyr Tyr Pro Phe Thr
1 5 10

15 <210> 326
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 326

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Leu Thr
1 5 10

25 <210> 327
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 327

Gln Gln Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Ile Thr
1 5 10

40 <210> 328
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (7)
 <223> Ser o Tyr

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Leu, Ser, Pro o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)
 <223> Este resto puede estar o no presente

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Phe, Ile, Val o Leu

10 <400> 328

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5 10

15 <210> 329
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 329

Gly Phe Asn Val Ser Ser Tyr Ser Ile His
1 5 10

25 <210> 330
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 330

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

35 <210> 331
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 331

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Ser Ile His
1 5 10

50 <210> 332
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 332

		Gly Phe Asn Val Tyr Tyr Ser Ser Ile His
		1 5 10
5	<210> 333 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 333	
		Gly Phe Asn Phe Tyr Tyr Ser Ser Ile His
		1 5 10
15	<210> 334 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 334	
		Gly Phe Asn Val Ser Ser Ser Tyr Ile His
		1 5 10
25	<210> 335 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 335	
		Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Tyr Met His
		1 5 10
40	<210> 336 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 336	
		Gly Phe Asn Phe Tyr Ser Ser Ser Ile His
		1 5 10
50	<210> 337 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (4) .. (4)

<223> Val, Ile o Phe

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (5) .. (8)

<223> Ser o Tyr

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (9) .. (9)

<223> Ile o Met

<400> 337

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His

20 **1 5 10**

<210> 338

<211> 17

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 338

Ser Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 339

35 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 339

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45 <210> 340

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 340

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 341

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 341

Ser Ile Ser Pro Ser Tyr Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 342

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 342

Ser Ile Tyr Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 343

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 343

40 **Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 344

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 344

5

Tyr Ile Ser Ser Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 345
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 345

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 346
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Ser o Tyr

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Tyr o Ser

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Pro o Ser

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (6)
 <223> Ser o Tyr

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gly o Ser

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Ser o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> Tyr o Ser
 5
 <400> 346
 Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 10
 <210> 347
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 347
 Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gln Gly Tyr Trp Trp Tyr Tyr Tyr Thr Gly Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Gly Met Asp Tyr
 20
 20
 <210> 348
 <211> 11
 <212> PRT
 25
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 30
 <400> 348
 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10
 35
 <210> 349
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 349
 Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
 1 5 10 15
 Leu Asp Tyr
 45
 <210> 350
 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 350

Trp Gln Gly Tyr Gly Phe Lys Tyr Tyr Trp Ser Tyr Tyr Val Ser Tyr
 1 5 10 15

Gly Gly Leu Asp Tyr
 20

10

<210> 351

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 351

20

Glu Tyr Tyr Trp Trp Tyr Lys Glu Ala Trp Tyr Ser Ala Gly Met Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 352

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 352

Glu Ser Tyr Ala Gly Val Pro Pro Tyr Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10

35

<210> 353

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 353

Gly Ile Met Phe Ser Ser Trp Trp Trp Tyr Tyr Asp Tyr Ser Asp Ala
 1 5 10 15

45

Leu Asp Tyr

<210> 354

<211> 19

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 354

Gly Ser Ile Pro Ser Tyr Trp Ser Ala Asp Trp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Leu Asp Tyr

10

<210> 355
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1) .. (1)
<223> Ser, Glu, Gly o Trp

25

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2) .. (2)
<223> Gly, Tyr, Ile, Gln o Ser

30

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3) .. (3)
<223> Tyr, Met, Gly o Ile

35

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4) .. (4)
<223> Tyr, Arg, Phe, Trp, Ala o Pro

40

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5) .. (5)
<223> Tyr, Trp, Ser o Gly

45

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6) .. (6)
<223> Gln, Tyr, Ser, Phe o Val

50

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7) .. (7)
<223> Gly, Thr, Trp, Lys o Pro

55

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8) .. (8)
<223> Tyr, Ala, Trp, Glu, Pro o Ser

60

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9) .. (9)

<223> Trp, Ile, Tyr o Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (10) .. (10)
 <223> Trp, Tyr, Gly, Asp o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (11)..(11)
 <223> Tyr, Ser, Phe, Trp o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (12) .. (12)
 <223> Tyr, Asp, Ser o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (13) .. (13)
 <223> Tyr, Ala o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (14)..(14)
 <223> Thr, Ser, Val, Gly, Tyr o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (15)..(15)
 <223> Gly, Asp, Ser, Met, Tyr o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (16)..(16)
 <223> Tyr, Ala, Gly o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 40 <222> (17) .. (17)
 <223> Tyr, Leu, Gly o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 45 <222> (18)..(18)
 <223> Este resto puede estar o no presente

<220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (19)..(19)
 <223> Met, Leu o no presente

<400> 355

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Gly Xaa Asp Tyr
20

55

<210> 356
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 356

Gln Gln Tyr Ser Tyr Tyr Pro Phe Arg
1 5

10 <210> 357
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 357

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
1 5 10

20 <210> 358
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 358

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Ser Leu Val Thr
1 5

30 <210> 359
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 359

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Ser Pro Phe Thr Phe
1 5 10

45 <210> 360
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 360

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Pro Ile Thr
1 5

5	<210> 361 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 361 Gln Gln Tyr Ser Tyr Ser Ser Tyr Leu Ile Thr 1 5 10
15	<210> 362 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 362 Gln Gln Ser Tyr Tyr Ser Pro Phe Thr 1 5
25	<210> 363 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 363 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Leu Val Thr 1 5
35	<210> 364 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
45	<220> <221> MOD_RES <222> (3) .. (6) <223> Tyr o Ser
50	<220> <221> MOD_RES <222> (7) .. (7) <223> Pro, Ser o Leu
55	<220> <221> MOD_RES <222> (8) .. (8) <223> Ser, Pro, Tyr o no presente
60	<220>

<221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Leu, Phe o no presente

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Phe, Val, Thr o Ile

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Arg, Thr o Phe

15

<400> 364

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

20

<210> 365
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 365
 cgtctattat tgtgtcgcgt aataagacta ctgggggtcaa gg 42

30

<210> 366
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 366
 cgtctattat tgtgtcgcgt aataagacta ctgggggtcaa gg 42

40

<210> 367
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(22)
 <223> a, c, g o t

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(30)
 <223> a, c, g o t

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (32)..(33)
 <223> a, c, g o t

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (35) .. (37)
 <223> a, c, g o t

10 <220>
 <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

15 <400> 367
 cgtctattat tgtgtcgcg nntacnnnnn snnsnnngst wtsgactact ggggtcaagg 60
 <210> 368
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(24)
 <223> a, c, g o t

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(28)
 <223> a, c, g o t

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (32)..(33)
 <223> a, c, g o t

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (35) .. (37)
 <223> a, c, g o t

45 <220>
 <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

50 <400> 368
 cgtctattat tgtgtcgcg nnnnsnnnta cnnsnnngst wtsgactact ggggtcaagg 60
 <210> 369
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(24)
 <223> a, c, g o t

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(30)
 <223> a, c, g o t

<220>

	<221> base_modificada	
	<222> (35)..(37)	
	<223> a, c, g o t	
5	<220>	
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
10	<400> 369 cgtctattat tgtctcgcgn nnnnsnnnnn stacnnngst wtsgactact ggggtcaagg	60
	<210> 370	
	<211> 60	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (20)..(24)	
	<223> a, c, g o t	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(30)	
	<223> a, c, g o t	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (32)..(33)	
	<223> a, c, g o t	
35	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (35) .. (37)	
	<223> a, c, g o t	
40	<220>	
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
45	<400> 370 cgtctattat tgtctcgcgn nnnnsnnnnn snnsnnngst wtsgactact ggggtcaagg	60
	<210> 371	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
55	<400> 371 gcagcttctg gcttcaacta ataactgg gtgcgtcagg	40
	<210> 372	
	<211> 52	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
65	<220>	

	<221> base_modificada	
	<222> (19) .. (19)	
	<223> a, c, g o t	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (22)..(23)	
	<223> a, c, g o t	
10	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (31) .. (32)	
	<223> a, c, g o t	
15	<400> 372	
	gcagcttctg gcttcaacnt cnnstactct nnsatscact ggggtgcgtca gg	52
	<210> 373	
	<211> 43	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<400> 373	
	ggcctggaat ggggtgcata ataatatgcc gatagcgtca agg	43
	<210> 374	
30	<211> 67	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (25) .. (26)	
40	<223> a, c, g o t	
	<400> 374	
	ggcctggaat ggggtgcata tatonnsyct tactactctt acacctotta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
45	<210> 375	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220>	
55	<221> base_modificada	
	<222> (32)..(33)	
	<223> a, c, g o t	
	<220>	
60	<221> base_modificada	
	<222> (35) .. (36)	
	<223> a, c, g o t	

<400> 375
cgctattat tgtctcgct ctactctta cnnsnsgst wsgactact ggggtcaagg 60

5 <210> 376
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 376
cgcaacttat tactgtcagc aataataaac gtcggacag ggtacc 46

15 <210> 377
<211> 76
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 377

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

25 <210> 378
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (23)..(24)
35 <223> a, c, g o t

<400> 378

cgcaacttat tactgtcagc aannstctta ctcttctctg dttacgttcg gacagggtac	60
c	61

40 <210> 379
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
5	<220> <221> base_modificada <222> (20)..(22) <223> a, c, g o t	
10	<220> <221> base_modificada <222> (29) .. (33) <223> a, c, g o t	
15	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(36) <223> a, c, g o t	
20	<220> <221> base_modificada <222> (38)..(40) <223> a, c, g o t	
25	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
	<400> 379	
	cgtctattat tgtgctcgcn nntactacnn nnnnnnnnnn gswtsgact actgggggtca	60
30	agg	63
	<210> 380 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> base_modificada <222> (20) .. (24) <223> a, c, g o t	
45	<220> <221> base_modificada <222> (26)..(27) <223> a, c, g o t	
50	<220> <221> base_modificada <222> (29)..(31) <223> a, c, g o t	
55	<220> <221> base_modificada <222> (38) .. (40) <223> a, c, g o t	
60	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 380	

	cgtctattat tgtgctcgcn nnnnsnnnn ntggtacnnn gstwtsagact actgggggtca	60
	agg	63
5	<210> 381 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (20)..(22) <223> a, c, g o t	
20	<220> <221> base_modificada <222> (29)..(33) <223> a, c, g o t	
25	<220> <221> base_modificada <222> (38)..(40) <223> a, c, g o t	
30	<220> <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
	<400> 381	
	cgtctattat tgtgctcgcn nntacbbnn nnnstacnnn gstwtsagact actgggggtca	60
	agg	63
35	<210> 382 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
45	<220> <221> base_modificada <222> (20)..(24) <223> a, c, g o t	
50	<220> <221> base_modificada <222> (29)..(31) <223> a, c, g o t	
55	<220> <221> base_modificada <222> (35) .. (36) <223> a, c, g o t	
60	<220> <221> base_modificada <222> (38) .. (40) <223> a, c, g o t	

	<220>		
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas		
5	<400> 382		
	cgtctattat tgtgctcgcn nnnnstacnn ntggnnnsnnn gstwtsgact actgggggtca	60	
	agg	63	
10	<210> 383		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
	<221> base_modificada		
20	<222> (20)..(22)		
	<223> a, c, g o t		
	<220>		
	<221> base_modificada		
25	<222> (26) .. (27)		
	<223> a, c, g o t		
	<220>		
	<221> base_modificada		
30	<222> (29)..(31)		
	<223> a, c, g o t		
	<220>		
	<221> base_modificada		
35	<222> (35) .. (36)		
	<223> a, c, g o t		
	<220>		
	<221> base_modificada		
40	<222> (38) .. (40)		
	<223> a, c, g o t		
	<220>		
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas		
45	<400> 383		
	cgtctattat tgtgctcgcn nntacnnnsnn ntggnnnsnnn gstwtsgact actgggggtca	60	
	agg	63	
50	<210> 384		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético		
	<220>		
60	<221> base_modificada		

	<222> (20).. (24)	
	<223> a, c, g o t	
5	<220> <221> base_modificada <222> (29) .. (33) <223> a, c, g o t	
10	<220> <221> base_modificada <222> (38)..(40) <223> a, c, g o t	
15	<220> <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
	<400> 384	
	cgtctattat tgtgctcgcn nnnnstacnn nnnstacnnn ggtwtsgact actgggggtca	60
20	agg	63
	<210> 385 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> base_modificada <222> (20)..(24) <223> a, c, g o t	
35	<220> <221> base_modificada <222> (26)..(27) <223> a, c, g o t	
40	<220> <221> base_modificada <222> (29) .. (33) <223> a, c, g o t	
45	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(36) <223> a, c, g o t	
50	<220> <221> base_modificada <222> (38)..(40) <223> a, c, g o t	
55	<220> <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
60	<400> 385	

	cgtctattat tgtgtctcgc nnnnsnnnsnn nnnnsnnnnn gstwtsgact actgggggtca	60
	agg	63
5	<210> 386 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (26) <223> a, c, g o t	
20	<220> <221> base_modificada <222> (31) .. (32) <223> a, c, g o t	
25	<220> <221> base_modificada <222> (34) .. (35) <223> a, c, g o t	
30	<220> <221> base_modificada <222> (40)..(42) <223> a, c, g o t	
35	<220> <221> base_modificada <222> (46)..(48) <223> a, c, g o t	
40	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 386	
	ggcctggaat gggttgcata catcnnsyct nnsnnsrncn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
45	<210> 387 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
55	<220> <221> base_modificada <222> (19) .. (20) <223> a, c, g o t	
60	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (26) <223> a, c, g o t	

	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (34) .. (35)	
5	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (40)..(42)	
10	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (46)..(48)	
15	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
20	<400> 387	
	ggcctggaat gggttgcann saccnnsyct tacnnsrgcn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
25	<210> 388	
	<211> 67	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (19) .. (20)	
35	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (25) .. (26)	
40	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (31)..(32)	
45	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (40)..(42)	
50	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (46)..(48)	
55	<223> a, c, g o t	
	<220>	
	<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
60	<400> 388	

	ggcctggaat gggttgcann saccnnsyct nntacrgcn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
5	<210> 389 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (19) .. (20) <223> a, c, g o t	
20	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (26) <223> a, c, g o t	
25	<220> <221> base_modificada <222> (31) .. (32) <223> a, c, g o t	
30	<220> <221> base_modificada <222> (34) .. (35) <223> a, c, g o t	
35	<220> <221> base_modificada <222> (40) .. (42) <223> a, c, g o t	
40	<220> <221> base_modificada <222> (46)..(48) <223> a, c, g o t	
45	<220> <223> véase memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 389	
	ggcctggaat gggttgcann saccnnsyct nnsnnsrgcn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
50	<210> 390 <211> 64 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
60	<220> <221> base_modificada <222> (23) .. (24) <223> a, c, g o t	

5	<220> <221> base_modificada <222> (26)..(33) <223> a, c, g o t	
10	<220> <221> base_modificada <222> (35) .. (39) <223> a, c, g o t	
15	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 390	
	cgcaacttat tactgtcagc aannsnnnnnn nnnsnnnnns ctgdttacgt tcggacaggg	60
	tacc	64
20	<210> 391 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<220> <221> base_modificada <222> (19)..(19) <223> a, c, g o t	
35	<220> <221> base_modificada <222> (22) .. (23) <223> a, c, g o t	
40	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (32) <223> a, c, g o t	
45	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 391 gcagcttctg gcttcaacnt cnnsnnnnnn nnsatscact ggggtcgtca gg	52
50	<210> 392 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 392	
60	Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His 1 5 10	

5	<210> 393 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 393
	Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His 1 5 10
15	<210> 394 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 394
	Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His 1 5 10
25	<210> 395 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 395
35	Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His 1 5 10
40	<210> 396 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 396
50	Gly Phe Asn Ile Gly Tyr Ser Phe Met His 1 5 10
55	<210> 397 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 397

		Gly Phe Asn Val Asp Tyr Ser Tyr Met His
		1 5 10
5	<210> 398	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 398	
		Gly Phe Asn Val Asp Tyr Ser Tyr Met His
		1 5 10
15	<210> 399	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 399	
		Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Phe Met His
		1 5 10
25	<210> 400	
	<211> 10	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 400	
		Gly Phe Asn Ile Val Tyr Ser Phe Met His
		1 5 10
40	<210> 401	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 401	
		Gly Phe Asn Ile Ile Tyr Ser Phe Met His
		1 5 10
50	<210> 402	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 402

	Gly	Phe	Asn	Ile	Val	Tyr	Ser	Phe	Ile	His
5	1				5					10

<210> 403

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 403

	Gly	Phe	Asn	Leu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Met	His
	1				5					10

<210> 404

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 404

	Gly	Phe	Asn	Val	Asp	Tyr	Ser	Phe	Met	His
	1				5					10

30

<210> 405

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 405

40

	Gly	Phe	Asn	Val	Ile	Tyr	Ser	Phe	Met	His
	1				5					10

<210> 406

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 406

	Gly	Phe	Asn	Val	Ala	Tyr	Ser	Leu	Met	His
	1				5					10

55 <210> 407

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 407

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Trp Met His
 1 5 10

10

<210> 408
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 408

Gly Phe Asn Leu Asp Tyr Ser Phe Met His
 1 5 10

20

<210> 409
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 409

Gly Phe Asn Phe Leu Tyr Ser Gly Ile His
 1 5 10

30

<210> 410
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 410

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
 1 5 10

40

<210> 411
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 411

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

5
 <210> 412
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 412

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

15
 <210> 413
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 413

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

25
 <210> 414
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 414

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

40
 <210> 415
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 415

Gly Phe Asn Ile Leu Tyr Ser Gly Ile His
1 5 10

50
 <210> 416
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 416

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
5	1				5					10

<210> 417

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 417

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

<210> 418

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 418

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

30 <210> 419

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 419

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
40	1				5					10

<210> 420

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 420

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

55 <210> 421

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 421

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

10

<210> 422

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 422

20

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

<210> 423

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 423

30

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

35

<210> 424

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 424

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

45

<210> 425

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 425

55

		Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
		1 5 10
5	<210> 426 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 426	
		Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
		1 5 10
15	<210> 427 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 427	
		Gly Phe Asn Ile Phe Tyr Ser Gly Ile His
		1 5 10
25	<210> 428 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 428	
		Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
		1 5 10
40	<210> 429 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 429	
		Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
		1 5 10
50	<210> 430 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 430

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
5	1				5					10

<210> 431

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 431

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

<210> 432

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 432

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

30

<210> 433

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 433

40

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

<210> 434

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 434

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
	1				5					10

55 <210> 435

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 435

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 436

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 436

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 437

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 437

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 438

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 438

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

<210> 439

 $\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 439

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

5
 <210> 440
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 440

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

15
 <210> 441
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 441

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

25
 <210> 442
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 442

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

40
 <210> 443
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 443

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

50
 <210> 444
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 444

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

10

<210> 445

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 445

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

20

<210> 446

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 446

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

35

<210> 447

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 447

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

45

<210> 448

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 448

55

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

5 <210> 449
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 449

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

 15 <210> 450
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 450

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

 25 <210> 451
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 451

 35 <210> 452
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 452

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

 45 <210> 453
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 55 <210> 454
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 453

Gly Phe Asn Leu Ser Tyr Ser Gly Met His
1 5 10

5 <210> 454
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 454

Gly Phe Asn Leu Leu Tyr Ser Gly Met His
1 5 10

15
20 <210> 455
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 455

Gly Phe Asn Val Ala Tyr Ser Gly Ile His
1 5 10

30 <210> 456
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 456

Gly Phe Asn Val Asp Tyr Ser Gly Met His
1 5 10

40 <210> 457
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 457

50
Gly Phe Asn Val Asp Tyr Ser Gly Met His
1 5 10

55 <210> 458
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 458

5

Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Tyr	Ser	Ser	Ile	His
1				5					10

<210> 459

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 459

Gly	Phe	Asn	Val	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile	His
1				5					10

20

<210> 460

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> Ile, Val, Phe o Leu

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> Ser, Gly, Asp, Val, Ile, Leu, Phe o Ala

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8) .. (8)

<223> Ser, Phe, Tyr, Leu, Trp o Gly

40

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9) .. (9)

<223> Met o Ile

45

<400> 460

Gly	Phe	Asn	Xaa	Xaa	Tyr	Ser	Xaa	Xaa	His
1				5					10

50

<210> 461

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60

<400> 461

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 462
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 462

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 463
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 463

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 464
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 464

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 465
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 465

Ser Ile Ala Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 466
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 466

Ser Ile Ala Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15
 <210> 467
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 467

Ser Ile Ala Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 468
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 468

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40
 <210> 469
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 469

5

Ser Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 470

<211> 17

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 470

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 471

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 471

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 472

<211> 17

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 472

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 473

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 473

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 **Gly**

<210> 474
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 474

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 475
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 475

Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

35 **Gly**

<210> 476
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 476

Ser Ile Thr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 477
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 477

Ser Ile Thr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 478
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 478

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 479
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 479

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 480
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 480

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 481
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 481

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15
 <210> 482
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 482

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 483
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 483

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40
 <210> 484
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 484

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 485

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 485

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 486

20

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 486

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 487

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 487

40

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 488

45

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 488

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 489

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 489

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 490

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 490

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 491

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 491

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

5
 <210> 492
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 492

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15
 <210> 493
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 493

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25
 <210> 494
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 494

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35
 <210> 495
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45
 <400> 495

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 496
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 496

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 497
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 497

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 498
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 498

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 499
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 499

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 500
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 500

15

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 501
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 501

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 502
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 502

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 503
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 503

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 504

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 504

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 505

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 505

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 506

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 506

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 507

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 507

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

10

Gly
 <210> 508
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 508

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 509
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 509

Ser Ile Tyr Pro Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly
 <210> 510
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 510

45

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 511
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 511

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 512
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 512

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 513
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 513

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 514
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 514

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 515
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 515

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 516
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 516

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 517
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 517

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 518
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 518

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 519
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 519

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 520
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 520

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 521
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 521

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 522
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 522

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 523

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 523

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 524

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 524

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 525

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 525

40 **Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 526

<211> 17

45 <212> PRT

	<213> Secuencia artificial
	<220>
5	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 526
	Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Thr Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
	1 5 10 15
	Gly
10	<210> 527
	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 527
	Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
	1 5 10 15
20	Gly
	<210> 528
	<211> 17
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
30	<400> 528
	Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
	1 5 10 15
	Gly
35	<210> 529
	<211> 17
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (3) .. (3)
45	<223> Tyr, Ala, Ser o Thr
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (4) .. (4)
50	<223> Ser o Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser o Thr

5

<400> 529

Ser Ile Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 530
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 530

Ser Tyr Asn Asn Thr Thr Ser Ile Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 531
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 531

Gly Tyr Ser Trp Tyr Asn Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 532
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 532

Gly Tyr Ser Trp Phe Asn Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 533
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 533

Gly Tyr Tyr Trp Phe Asp Ala Met Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 534
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 534

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

15
20 <210> 535
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 535

Ser Tyr Ser Tyr Arg Glu Thr Met Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 536
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 536

Ser Tyr Ser Tyr Arg Glu Thr Met Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 537
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 537

50
Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 538
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
5	<400> 538	
	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr	
	1 5 10	
10	<210> 539	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 539	
	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr	
	1 5 10	
20	<210> 540	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 540	
30	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr	
	1 5 10	
35	<210> 541	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 541	
	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr	
	1 5 10	
45	<210> 542	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 542	
55	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr	
	1 5 10	

5 <210> 543
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 543

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 544
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 544

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 545
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 545

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 546
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 546

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

25 <210> 547
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 547

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
5	<210> 548	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 548	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
15	<210> 549	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 549	
25		Ser Tyr Ser Tyr Ser Phe Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
30	<210> 550	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 550	
		Ser Tyr Ser Tyr Phe Met Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
40	<210> 551	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 551	
50		Ser Tyr Ser Tyr His Val Ala Phe Asp Tyr
		1 5 10
55	<210> 552	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 552	
5		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr 1 5 10
	<210> 553	
	<211> 10	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
15	<400> 553	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr 1 5 10
	<210> 554	
	<211> 10	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 554	
		Ser Tyr Ser Tyr His Leu Ala Phe Asp Tyr 1 5 10
30		
	<210> 555	
	<211> 10	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
40	<400> 555	
		Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ala Phe Asp Tyr 1 5 10
	<210> 556	
	<211> 10	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 556	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ile Ala Met Asp Tyr 1 5 10
55		
	<210> 557	
	<211> 10	
	<212> PRT	

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 557

Ser	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Met	Gly	Met	Asp	Tyr
1				5					10

10

<210> 558

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 558

Ser	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Met	Gly	Met	Asp	Tyr
1				5					10

20

<210> 559

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 559

Ser	Tyr	Ser	Tyr	His	Val	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

35

<210> 560

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 560

Ser	Tyr	Ser	Tyr	His	Met	Gly	Met	Asp	Tyr
1				5					10

45

<210> 561

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 561

55

		Ser Tyr Ser Tyr His Leu Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
5	<210> 562 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 562	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Gln Gly Phe Asp Tyr
		1 5 10
15	<210> 563 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 563	
		Ser Tyr Ser Tyr Ser Met Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
25	<210> 564 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 564	
		Ser Tyr Ser Tyr Phe Leu Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
40	<210> 565 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 565	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
50	<210> 566 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220>	

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 566

	Ser Tyr Ser Tyr Ser Glu Ala Leu Asp Tyr
5	1 5 10

<210> 567

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 567

Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 568

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 568

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 569

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 569

Ser Tyr Ser Tyr Phe Met Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 570

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 570

Ser Tyr Ser Tyr Phe Leu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 571

	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
5	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 571
10	Ser Tyr Ser Tyr Phe Leu Ala Met Asp Tyr 1 5 10
	<210> 572
	<211> 10
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
20	<400> 572
	Ser Tyr Ser Tyr Tyr Leu Ala Met Asp Tyr 1 5 10
	<210> 573
25	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 573
	Ser Tyr Ser Tyr Phe Ile Gly Met Asp Tyr 1 5 10
35	<210> 574
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
40	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 574
45	Ser Tyr Ser Tyr His Leu Gly Met Asp Tyr 1 5 10
	<210> 575
	<211> 10
50	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
55	<400> 575

		Ser Tyr Ser Tyr Thr Glu Ala Phe Asp Tyr
		1 5 10
5	<210> 576 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 576	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
15	<210> 577 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 577	
		Ser Tyr Ser Tyr Thr Tyr Gly Leu Asp Tyr
		1 5 10
25	<210> 578 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 578	
		Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
		1 5 10
40	<210> 579 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 579	
		Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Gly Met Asp Tyr
		1 5 10
50	<210> 580 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55		

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 580

5

Ser Tyr Ser Tyr Trp Val Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 581

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 581

Ser Tyr Ser Tyr Thr Leu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 582

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 582

Ser Tyr Ser Tyr Thr Met Gly Leu Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 583

<211> 10

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 583

Ser Tyr Ser Tyr Phe Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 584

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 584

Ser Tyr Ser Tyr His Met Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

55

5	<210> 585 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 585 Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Gly Met Asp Tyr 1 5 10
15	<210> 586 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 586 Ser Tyr Ser Tyr Tyr Glu Ala Phe Asp Tyr 1 5 10
25	<210> 587 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 587 Ser Tyr Ser Tyr Arg Met Ala Phe Asp Tyr 1 5 10
35	<210> 588 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 588 Ser Tyr Ser Tyr His Ile Ala Phe Asp Tyr 1 5 10
45	<210> 589 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 589

Ser Tyr Ser Tyr Ser Val Gly Met Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 590
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 590

Ser Tyr Ser Tyr Thr Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

15

<210> 591
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 591

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

25

<210> 592
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 592

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

40

<210> 593
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 593

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

50

<210> 594
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 594

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 595
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 595

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 596
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 596

30 <210> 597
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 597

Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 598
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Ser o Gly

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ser, Asn o Tyr

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Tyr, Asn o Trp

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Thr, Tyr, Phe, Arg, Ser, His o Trp

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Thr, Asn, Asp, Ser, Glu, Phe, Met, Val, Leu, Ile o Tyr

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser, Ala, Thr o Gly

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Ile, Met, Phe o Leu

30

<400> 598

Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
 1 5 10

35

<210> 599
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 599

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
 1 5 10

45

<210> 600
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 600

55

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
 1 5 10

60

<210> 601
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 601

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

10

<210> 602

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 602

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

20

<210> 603

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 603

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

35

<210> 604

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 604

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

45

<210> 605

<211> 10

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55

<400> 605

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

5
 <210> 606
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 606

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

15
 <210> 607
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 607

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

25
 <210> 608
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 608

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

40
 <210> 609
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 609

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

50
 <210> 610
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 610

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

<210> 611
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 611

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

20 <210> 612
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 612

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

30 <210> 613
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 613

Gly Phe Asn Phe Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

45 <210> 614
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 614

Gly Phe Asn Ile Lys Gly Ser Leu Ile His
1 5 10

55 <210> 615

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 615

Gly Phe Asn Ile Lys Gly Ser Ile Met His
 1 5 10

10

<210> 616
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 616

Gly Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ile Met His
 1 5 10

20

<210> 617
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 617

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
 1 5 10

30

<210> 618
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 618

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
 1 5 10

40

<210> 619
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 619

50

<210> 619
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 619

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

5
<210> 620
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 620

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

15
<210> 621
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 621

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

25
<210> 622
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
35
<400> 622

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

40
<210> 623
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 623

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

50
<210> 624
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55
<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 624

	Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
5	1 5 10

<210> 625

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 625

Gly Phe Asn Leu Ala Ser Ser Phe Met His
1 5 10

<210> 626

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 626

Gly Phe Asn Leu Val Ser Ser Leu Met His
1 5 10

30 <210> 627

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 627

Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His
1 5 10

<210> 628

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 628

Gly Phe Asn Val Lys Trp Asn Tyr Ile His
1 5 10

55 <210> 629

<211> 10

<212> PRT

	<213> Secuencia artificial
	<220>
5	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<400> 629
	Gly Phe Asn Val Val Ser Ser Phe Ile His
	1 5 10
10	<210> 630
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
	<220>
	<221> MOD_RES
20	<222> (4) .. (4)
	<223> Ile, Phe, Leu o Val
	<220>
	<221> MOD_RES
25	<222> (5) .. (5)
	<223> Ser, Lys, Ala o Val
	<220>
	<221> MOD_RES
30	<222> (6) .. (6)
	<223> Ser, Gly, Thr o Trp
	<220>
	<221> MOD_RES
35	<222> (7) .. (7)
	<223> Ser, Gly o Asn
	<220>
	<221> MOD_RES
40	<222> (8) .. (8)
	<223> Tyr, Leu, Ile o Phe
	<220>
	<221> MOD_RES
45	<222> (9) .. (9)
	<223> Ile o Met
	<400> 630
	Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
	1 5 10
50	<210> 631
	<211> 17
	<212> PRT
55	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
60	<400> 631

Ala Ile Ala Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 632
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 632

Ala Ile Pro Pro Phe Tyr Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 633
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 633

Ala Ile Gln Pro Tyr Phe Gly Trp Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 634
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 634

Ala Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 635
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 635

Asp Ile Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 636

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 636

15

Asp Ile Ser Pro Trp Tyr Gly Gly Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 637

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 637

Asp Ile Ser Ser Tyr Thr Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 638

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 638

Phe Ile Gln Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

40

Gly

<210> 639

<211> 17

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 639

Phe Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 640

10

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 640

Gly Ile Thr Pro Tyr Leu Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

20

<210> 641

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 641

30

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

Gly

<210> 642

<211> 17

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 642

Ile Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 643

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 643

Ser Ile Thr Pro Tyr Tyr Gly Trp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10

<210> 644

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 644

Trp Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20

Gly

<210> 645

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 645

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35

<210> 646

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 646

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45

<210> 647

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 647

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

10 **Gly**

<210> 648
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 648

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 649
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 649

Tyr Ile Gly Pro Phe Thr Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

35 <210> 650
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 650

Tyr Ile Ser Pro Phe Leu Ser Thr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 651
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 651

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 652
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 652

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 653
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 653

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 654
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 654

Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 655

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 655

Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

15

<210> 656

<211> 17

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 656

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 657

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 657

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 658

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 658

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 659

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 659

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 660

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 660

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 661

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 661

40 **Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15

Gly

<210> 662

<211> 17

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

```

5      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (1) .. (1)
      <223> Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Ser, Trp o Tyr

```

```

10      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (3) .. (3)
      <223> Ala, Pro, Gln, Ser, Thr o Gly

```

```
15      <220>  
      <221> MOD_RES  
      <222> (4) .. (4)  
      <223> Pro o Ser
```

```

20      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (5) .. (5)
      <223> Tyr o Phe

```

```

25      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (6) .. (6)
      <223> Leu, Tyr, Phe o Thr

```

```

30      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (7)..(7)
      <223> Gly o Ser

```

```

35      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (8) .. (8)
      <223> Ser, Trp, Thr, Gly o Arg

```

```

40      <220>
      <221> MOD_RES
      <222> (10) .. (10)
      <223> Ser, Ile, Lys, Asp, Asn, Gly o Arg

```

45 <400> 662

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

50 <210> 663
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 663

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 664
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 664

 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 665
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 665

 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 666
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 666

 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 667
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 667

 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 668
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 668

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 669

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 669

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

15

<210> 670

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 670

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 671

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 671

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40

<210> 672

<211> 11

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 672

50

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 673

<211> 11

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 673

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

10

<210> 674

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 674

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 675

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30

<400> 675

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

35

<210> 676

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 676

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 677

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 677

55

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

	<210> 678	
	<211> 11	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
10	<400> 678	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr 1 5 10
	<210> 679	
15	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 679	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr 1 5 10
25	<210> 680	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 680	
35		
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr 1 5 10
	<210> 681	
40	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 681	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr 1 5 10
50	<210> 682	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 682	

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

5
 <210> 683
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 683

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

15
 <210> 684
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 684

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

25
 <210> 685
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 685

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

35
 <210> 686
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 686

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

45
 <210> 687
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 55

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 687

5

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 688
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 688

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

20

<210> 689
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 689

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

30

<210> 690
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 690

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

45

<210> 691
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 691

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

55

<210> 692
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 692

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 693
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 693

20 <210> 694
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 694

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 695
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 695

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

45 <210> 696
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 696

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

5
 <210> 697
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 697

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

15
 <210> 698
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 698

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

25
 <210> 699
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 699

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

40
 <210> 700
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 700

Gly Phe Asn Ile Ser Tyr Ser Ser Met His
1 5 10

50
 <210> 701
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 701

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
5	1				5					10

<210> 702

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 702

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

<210> 703

20 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 703

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
1				5					10

30 <210> 704

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 704

	Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ser	Met	His
40	1				5					10

<210> 705

45 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

55 <223> Ser o Phe

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (8)
 <223> Ser o Gly

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Met o Ile

 <400> 705

 Gly Phe Asn Ile Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10

 <210> 706
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 706

 Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 707
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 707

 Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 708
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 708

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 709
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 709

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 710
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 710

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 711
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 711

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 712
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 712

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5

<210> 713

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 713

15

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 714

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 714

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30

<210> 715

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 715

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40

<210> 716

<211> 17

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 716

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10 <210> 717

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 717

Ser Tyr Ser Tyr Ser Glu Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 718
 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 718

30 **Ser Tyr Ser Tyr Tyr Ser Ala Met Asp Tyr**
1 5 10

35 <210> 719
 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 719

Ser Tyr Ser Tyr Ser Leu Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 720
 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 720

Ser Tyr Ser Tyr Ser Phe Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 721
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 721

Ser Tyr Ser Tyr Arg Met Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 722
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 722

Gly Tyr Ser Trp Phe Asn Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 723
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 723

Ser Tyr Ser Tyr His Leu Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 724
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 724

Ser Tyr Ser Tyr Ser Val Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 725
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 725

Ser Tyr Ser Tyr His Val Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 726

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 726

15

Ser Tyr Ser Tyr Phe Leu Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 727

<211> 11

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Ser o Gly

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4) .. (4)

<223> Tyr o Trp

35

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5) .. (5)

<223> Ser, Tyr, Arg, Phe o His

40

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Glu, Ser, Leu, Phe, Met, Asn o Val

45

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Ala o Gly

50

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Leu, Met, Phe o Ile

55

<400> 727

Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

5
 <210> 728
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 728

10
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
 1 5 10

15
 <210> 729
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 729

20
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
 1 5 10

25
 <210> 730
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 730

30
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
 1 5 10

35
 <210> 731
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 731

40
 Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
 1 5 10

45
 <210> 732
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 732

50
 <210> 732
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 732

55
 <210> 732
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 732

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
1 5 10

5
 <210> 733
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 733

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
1 5 10

15
 <210> 734
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 734

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
1 5 10

25
 <210> 735
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 735

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
1 5 10

40
 <210> 736
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 736

Gln Gln Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Ile Thr
1 5 10

50
 <210> 737
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 737

Gln	Gln	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr
1				5					10

5

<210> 738

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 738

15

Gln	Gln	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr
1				5					10

<210> 739

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<400> 739

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10

30

<210> 740

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 740

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10

40

<210> 741

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 741

50

Gly	Phe	Asn	Val	Lys	Trp	Asn	Tyr	Ile	His
1				5					10

55

<210> 742

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 742

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10

10

<210> 743

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 743

20

Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Gly	Ser	Ile	Met	His
1				5					10

<210> 744

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 744

30

Gly	Phe	Asn	Val	Lys	Thr	Gly	Leu	Ile	His
1				5					10

35

<210> 745

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 745

Gly	Phe	Asn	Ile	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	His
1				5					10

45

<210> 746

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 746

55

Gly	Phe	Asn	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Met	His
1				5					10

5 <210> 747
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 747

Gly Phe Asn Val Val Ser Ser Phe Ile His
1 5 10

 15 <210> 748
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 748

Gly Phe Asn Ile Ser Ser Ser Tyr Ile His
1 5 10

 25 <210> 749
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ile, Val o Leu

 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ser, Lys o Val

 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Ser, Trp, Gly o Thr

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser, Asn o Gly

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Tyr, Ile, Leu o Phe

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met

<400> 749

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

5 <210> 750
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 750

Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 751
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 751

Phe Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 752
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 752

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

40 <210> 753
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 753

Asp Ile Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 754
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 754

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 755
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 755

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 756
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 756

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

Gly

<210> 757
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 757

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 **Gly**

<210> 758

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 758

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 759

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 759

Ala Ile Gln Pro Tyr Phe Gly Trp Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 760

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>

40 <221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> Tyr, Phe, Asp, His o Ala

<220>

45 <221> MOD_RES

<222> (3) .. (3)

<223> Ser, Ala o Gln

<220>

50 <221> MOD_RES

<222> (6) .. (6)

<223> Leu, Tyr o Phe

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (7) .. (7)
<223> Ser o Gly

<220>
10 <221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Ser, Thr o Trp

<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Ser, Asn, Lys o Ile

<400> 760

	Xaa	Ile	Xaa	Pro	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5					10					15	

20 **Gly**

<210> 761
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 761

	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Trp	Tyr	Thr	Ala	Ile	Asp	Tyr
	1				5					10	

35 <210> 762
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 762

	Glu	Tyr	Tyr	Arg	Trp	Tyr	Thr	Ala	Ile	Asp	Tyr
	1				5					10	

45 <210> 763
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 763

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

5
 <210> 764
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 764

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

15
 <210> 765
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 765

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

25
 <210> 766
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 766

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40
 <210> 767
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 767

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

50
 <210> 768
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 768

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 769

$\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 769

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 770

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

25 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 770

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

30 $\langle 210 \rangle$ 771

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 771

40 Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 772

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 $\langle 400 \rangle$ 772

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
1 5 10

55 <210> 773

 $\langle 211 \rangle$ 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 773	
5		
		Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
		1 5 10
	<210> 774	
	<211> 11	
10	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
15	<400> 774	
		Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
		1 5 10
	<210> 775	
	<211> 11	
20	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 775	
		Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
		1 5 10
30		
	<210> 776	
	<211> 11	
	<212> PRT	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
40	<400> 776	
		Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
		1 5 10
	<210> 777	
	<211> 11	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 777	
		Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
		1 5 10
55		

5
 <210> 778
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15
 <400> 778

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10

20
 <210> 779
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30
 <400> 779

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10

35
 <210> 780
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45
 <400> 780

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10

50
 <210> 781
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60
 <400> 781

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
 1 5 10

65
 <210> 782
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

75
 <400> 782

ES 2 535 856 T3

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Phe Thr
1 5 10

<210> 783
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 783

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 784
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 784

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 785

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

<222> (19) .. (19)

<223> a, c, g, o t

<220>

<221> base_modificada

<222> (22)..(33)

<223> a, c, g, o t

<220>

<223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas

<400> 785

gcagctctg gctcaacnt cnnnnnnnnn nnnnatscact ggggtgcgtca gg 52

<210> 786

<211> 67

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

<222> (19) .. (20)

	<223> a, c, g, o t	
5	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (27) <223> a, c, g, o t	
10	<220> <221> base_modificada <222> (40)..(42) <223> a, c, g, o t	
15	<220> <221> base_modificada <222> (46)..(48) <223> a, c, g, o t	
20	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
	<400> 786	
	ggcctggaat gggttgcann saccnnnccg tactacggtn nnaccnnnta tgccgatagc	60
25	gtcaagg	67
30	<210> 787 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (27) <223> a, c, g, o t	
45	<220> <221> base_modificada <222> (34) .. (35) <223> a, c, g, o t	
50	<220> <221> base_modificada <222> (40) .. (42) <223> a, c, g, o t	
55	<220> <221> base_modificada <222> (46)..(48) <223> a, c, g, o t	
	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas	
	<400> 787	

	ggcctggaat gggttgcata catcnnnccg tacnnsaggtn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
5	<210> 788 <211> 67 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<220> <221> base_modificada <222> (19) .. (20) <223> a, c, g, o t	
20	<220> <221> base_modificada <222> (25) .. (27) <223> a, c, g, o t	
25	<220> <221> base_modificada <222> (34) .. (35) <223> a, c, g, o t	
30	<220> <221> base_modificada <222> (40) .. (42) <223> a, c, g, o t	
35	<220> <221> base_modificada <222> (46)..(48) <223> a, c, g, o t	
40	<220> <223> veáse memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas <400> 788	
	ggcctggaat gggttgcann saticnnnccg tacnnsaggtn nnaccnnnta tgccgatagc	60
	gtcaagg	67
45	<210> 789 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético <400> 789	
55	Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Phe Met His 1 5 10 <210> 790 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial	

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 795

Gly Phe Asn Leu Lys Thr Gly Phe Ile His
1 5 10

10 <210> 796
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 796

20 **Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Tyr Met His**
1 5 10

25 <210> 797
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 797

Gly Phe Asn Val Lys Thr Gly Leu Ile His
1 5 10

35 <210> 798
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 798

Gly Phe Asn Val Met Ile Gly Ile Ile His
1 5 10

45 <210> 799
<211> 10
<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 799

Gly Phe Asn Ile Lys Thr Gly Phe Met His
1 5 10

5 <210> 800
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Val, Ile o Leu

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Lys o Met

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Thr, Met, Asn, Arg o Ile

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Gly, Val o Phe

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Phe, Ile, Tyr o Leu

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Met o Ile

<400> 800

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

45 <210> 801
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 801

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Trp Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

55 Gly

5 <210> 802
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 802
 10
 Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Val Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 15 <210> 803
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 20 <400> 803
 Tyr Ile Ser Pro Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 25 <210> 804
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 804
 Tyr Ile Ile Pro Tyr Ser Gly Asn Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 805
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 45 <400> 805

Tyr Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Arg Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 806
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 806

Tyr Ile Ser Pro Tyr Leu Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 807
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 807

Tyr Ile Ser Pro Tyr Trp Gly Ser Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 808
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 808

Tyr Ile Ser Pro Tyr Tyr Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 809
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 809

Tyr	Ile	Ser	Pro	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

5 <210> 810
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 810

Tyr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

15 <210> 811
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 811

Tyr	Ile	Thr	Pro	Tyr	Trp	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

30 <210> 812
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ser, Ile o Thr

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Tyr, Leu, Asp, Ser o Trp

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Trp, Val, Ser, Asn, Arg o Tyr

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Arg, Asn, Val, Thr, Ser o Lys

<400> 812

Tyr Ile Xaa Pro Tyr Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 813
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 813

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 814
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 814

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 815
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 815

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

<210> 816
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 816

		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10
5	<210> 817	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 817	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10
15	<210> 818	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 818	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10
25	<210> 819	
	<211> 11	
	<212> PRT	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 819	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10
40	<210> 820	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 820	
		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10
50	<210> 821	
	<211> 11	
	<212> PRT	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	

<400> 821

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

5 <210> 822
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 822

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

15 <210> 823
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 823

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

30 <210> 824
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 824

Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 825
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Val, Phe, Leu o Ile

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ser o Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (8)
 <223> Ser o Tyr
 5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met
 10
 <400> 825

 Gly Phe Asn Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10
 15
 <210> 826
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> Ser o Tyr
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Pro o Ser
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser o Gly
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Ser o Tyr
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> Ser o Tyr
 45
 <400> 826

 Ser Ile Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 50
 Gly
 <210> 827
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ser o Phe

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (8)
 <223> Ser o Gly

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met
 <400> 827

Gly Phe Asn Ile Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

20 <210> 828
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 828

Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Ser Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30 **Gly**

35 <210> 829
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Ser o Gly

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Tyr o Trp

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ser, Tyr, Arg, Phe o His

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)

<223> Glu, Ser, Leu, Phe, Met, Asn o Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ala o Gly

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Leu, Met, Phe o Ile

10

<400> 829

15

	Xaa	Tyr	Ser	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Tyr
	1				5					10

<210> 830
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (7)
 <223> Ser o Tyr

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Leu, Ser, Pro o Tyr

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Este resto puede estar o no presente

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Phe, Ile, Val o Leu

45

<400> 830

50

	Gln	Gln	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Thr
	1				5					10	

<210> 831
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Val, Ile o Phe

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (5) .. (8)
 <223> Ser o Tyr
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met
 10 <400> 831

 Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
 1 5 10

 <210> 832
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 25 <223> Ser o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 30 <223> Ser o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 35 <223> Pro o Ser

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (6)
 40 <223> Ser o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 45 <223> Ser o Gly

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 50 <223> Ser o Tyr

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 55 <223> Ser o Tyr

 <400> 832

Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 833
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ile, Val o Leu

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Ser, Lys o Val

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Ser, Trp, Gly o Thr

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Ser, Asn o Gly

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Tyr, Ile, Leu o Phe

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met

<400> 833

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

45 <210> 834
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1) .. (1)
 <223> Tyr, Phe, Asp, His o Ala

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (3) .. (3)
 <223> Ser, Ala o Gln

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Leu, Tyr o Phe

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser o Gly

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Ser, Thr o Trp

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10) .. (10)
 <223> Ser, Asn, Lys o Ile

25
 <400> 834

Xaa	Ile	Xaa	Pro	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Xaa	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

30
 <210> 835
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ile, Val o Leu

45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5) .. (5)
 <223> Lys o Met

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6) .. (6)
 <223> Thr, Met, Asn, Arg o Ile

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Gly, Val o Phe

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Tyr, Ile, Leu o Phe

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ile o Met

5 <400> 835

Gly Phe Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His
1 5 10

10 <210> 836
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser, Ile o Thr

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Leu, Tyr, Asp, Ser o Trp

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Trp, Val, Ser, Asn, Arg o Tyr

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11) .. (11)
 <223> Arg, Asp, Val, Thr, Ser o Lys

<400> 836

Ala Tyr Ile Xaa Pro Tyr Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

40 <210> 837
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 837

Ser Arg Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 838
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2) .. (2)
 <223> Tyr, Phe, Asp, His o Ala

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> Ser, Ala o Gln

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7) .. (7)
 <223> Leu, Tyr y Phe

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> Ser o Gly

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Ser, Thr o Trp

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Ser, Asn, Lys o Ile

35
 <400> 838
 Ala Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

40
 <210> 839
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 839

45
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

50
 <210> 840
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 840

55
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 1 5 10
 <210> 841

<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 841

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

10 <210> 842
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 842

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

20 <210> 843
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 843

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

25

<210> 844
<211> 13
<212> PRT
30 <213> *Homo sapiens*

<400> 844

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

35

<210> 845
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 845

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

45 <210> 846
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 846

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10

<210> 847

ES 2 535 856 T3

<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 847

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

10 <210> 848
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 848

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

20 <210> 849
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 849

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

30

<210>	850
<211>	13
<212>	PRT
<213>	<i>Homo sapiens</i>

<400> 850

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 851
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 851

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

45 <210> 852
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 852

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

55 <210> 853
 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 853

5

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 854

<211> 14

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 854

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

15

<210> 855

$\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 855

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

25

<210> 856

 $\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 856

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 857

$\langle 211 \rangle$ 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 857

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

45

<210> 858

 $\langle 211 \rangle$ 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 858

50

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 859
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 859

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10

<210> 860
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 860

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

20

<210> 861
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 861

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

30

<210> 862
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 862

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

35

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

40

<210> 863
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 863

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

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

5 <210> 864

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 864

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

15 <210> 865

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 865

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

25 <210> 866

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 866

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

30 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 867

<211> 32

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 867

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 868

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 868

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

<210> 869

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 869

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 870

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 870

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 871

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 871

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
20 25 30

<210> 872
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 872

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
20 25 30

10

<210> 873
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 873

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

20

<210> 874
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 874

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

30

<210> 875
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 875

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

35

<210> 876
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 876

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

5
<210> 877
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 877

10
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15
<210> 878
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 878

20
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25
<210> 879
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 879

30
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

35
<210> 880
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 880

40
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

45
<210> 881
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 881

50
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 882
<211> 11
<212> PRT

ES 2 535 856 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 882

5 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 883

<211> 11

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 883

15 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 884

<211> 11

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 884

25 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 885

<211> 11

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 885

35 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 886

35 <211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 886

40 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 887

45 <211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 887

50 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 888

55 <211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 888

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

5 <210> 889
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 889

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

15 <210> 890
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 890

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

25 <210> 891
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 891

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30 <210> 892
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 892

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

40 <210> 893
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 893

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

50 <210> 894
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 894

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

5

<210> 895

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 895

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

15

<210> 896

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 896

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

25

<210> 897

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 897

Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

30

<210> 898

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 898

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

40

<210> 899

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<400> 899

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

50

<210> 900

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 900

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 901

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 901

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 902

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 902

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 903

<211> 32

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 903

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 904

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 904

		Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
		1 5 10
5	<210> 905	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 905	
10		Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
		1 5 10
15	<210> 906	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 906	
20		Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
		1 5 10
25	<210> 907	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 907	
30		Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
		1 5 10
35	<210> 908	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 908	
40		Glu Tyr Tyr Arg Trp Tyr Thr Ala Ile Asp Tyr
		1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a:

5 (i) poliubiquitina con enlaces de lisina 48, que comprende:

(a) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu01, apu02, apu03, apu04, apu05, apu06, apu07, apu08, apu09, apu10, apu11, apu12, apu13, apu14 o apu15 mostradas como SEC ID N°: 265-279; SEC ID N°: 281-295; y SEC ID N°: 297-311, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu01, apu02, apu03, apu04, apu05, apu06, apu07, apu08, apu09, apu10, apu11, apu12, apu13, apu14 o apu15 mostrados como SEC ID N°: 313-327; o

(b) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu2.01, apu2.02, apu2.03, apu2.04, apu2.05, apu2.06, apu2.07, apu2.08, apu2.09 o apu2.10 mostrados como las SEC ID N°: 695-704; SEC ID N°: 706-715; y SEC ID N°: 717-726, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu2.01, apu2.02, apu2.03, apu2.04, apu2.05, apu2.06, apu2.07, apu2.08, apu2.09 o apu2.10 mostradas como SEC ID N°: 728-737;

o

(ii) poliubiquitina con enlaces de lisina 63, que comprende:

(a) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu17, apu18, apu19, apu20, apu21, apu22, apu23 y apu24 mostradas como las SEC ID N°: 329-336, 338-345 y 347-354, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu17, apu18, apu19, apu20, apu21, apu22, apu23 y apu24 mostrados como las SEC ID N°: 356-363; o

(b) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu2.11, apu2.12, apu2.13, apu2.14, apu2.15, apu2.16, apu2.17, apu2.18, apu2.19 y apu2.20 mostradas como las SEC ID N°: 739-748, 750-759 y 761-770, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 como se muestra para el clon correspondiente seleccionado de apu2.11, apu2.12, apu2.13, apu2.14, apu2.15, apu2.16, apu2.17, apu2.18, apu2.19 y apu2.20 mostradas como SEC ID N°: 772-781; o

(c) secuencias de HVR-H1, HVR-H2 y HVR-H3 como se muestran para un clon seleccionado de apu3.01, apu3.02, apu3.03, apu3.04, apu3.05, apu3.06, apu3.07, apu3.08, apu3.09, apu3.10 y apu3.11 mostrados como las SEC ID N°: 789-799, 801-811 y 813-823, respectivamente, y una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 777.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i), que comprende:

(a) una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 269, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 285, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 301, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 317; o

(b) una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 701, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 712, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 723, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 734.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 (ii), que comprende:

(a) una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 330, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 339, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 348, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 357; o

(b) una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 739, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 750, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 761, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 772; o

una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 740, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 751, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 762, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 773; o

una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 744, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 755, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 766, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 777; o

(c) una secuencia de HVR-H1 mostrada como SEC ID N°: 795, una secuencia de HVR-H2 mostrada como SEC ID N°: 807, una secuencia de HVR-H3 mostrada como SEC ID N°: 819, una secuencia de HVR-L1 mostrada como SEC ID N°: 79, una secuencia de HVR-L2 mostrada como SEC ID N°: 80, y una secuencia de HVR-L3 mostrada como SEC ID N°: 777.

4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une específicamente a una proteína poliubiquitinada.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo inhibe la degradación de la proteína poliubiquitinada.

6. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo modula al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina.

7. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo inhibe al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina.

8. El anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo estimula al menos una ruta de señalización mediada por poliubiquitina.

9. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.

11. Una célula hospedadora que comprende el vector de la reivindicación 10.

12. Una línea celular capaz de producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

13. Un método para producir el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones en las que se produce el anticuerpo.

14. Una composición que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un método para identificar la presencia de poliubiquitina o una proteína poliubiquitinada en una muestra, que comprende poner contacto la muestra con al menos un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

16. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en terapia.

17. El anticuerpo de la reivindicación 16, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, leucemia, distrofia muscular, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, fibrosis quística, síndrome de Angelman, síndrome de Liddle, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick y enfermedad de Paget.

18. Un método para determinar la presencia de una poliubiquitina o una proteína poliubiquitinada en una muestra que se sospecha que contiene una poliubiquitina o una proteína poliubiquitinada, que comprende exponer la muestra a al menos un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y determinar la unión del al menos un anticuerpo con una poliubiquitina o una proteína poliubiquitinada en la muestra.

19. Un método para separar la proteína poliubiquitinada de proteína no poliubiquitinada en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con al menos un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

20. Un método para determinar la función y/o la actividad de poliubiquitina en una célula o muestra que comprende poner en contacto la célula o muestra con al menos un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y evaluar el efecto de dicha etapa de contacto en la célula o muestra.

21. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1 (ii), en donde el anticuerpo se une con un epítipo en la poliubiquitina con enlaces de lisina 63, y en donde el epítipo incluye restos tanto en una primera subunidad de ubiquitina como en una segunda subunidad de ubiquitina de la poliubiquitina con enlaces de lisina 63.

22. El anticuerpo aislado de la reivindicación 21, en el que (a) el epítipo incluye al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionado de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-58, Asn-60,

5 Ile-61 y Gln-62 o (b) el epítipo incluye al menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionada de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, Ile-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74 y Gly-75; o (c) el epítipo incluye al menos un resto en una primera subunidad de ubiquitina seleccionado de Glu-18, Pro-19, Ser-20, Asp-21, Thr-55, Leu-56, Ser-57, Asp-58, Asn-60, Ile-61 y Gln-62, y al menos un resto en una segunda subunidad de ubiquitina seleccionado de Leu-8, Thr-9, Glu-34, Gly-35, Ile-36, Pro-37, Asp-39, Gln-40, Leu-71, Arg-72, Leu-73, Arg-74 y Gly-75.

23. Un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 21-22.

1 MET GLN ILE PHE VAL LYS THR LEU THR GLY LYS THR ILE THR
15 LEU GLU VAL GLU PRO SER ASP THR ILE GLU ASN VAL LYS ALA
29 LYS ILE GLN ASP LYS GLU GLY ILE PRO PRO ASP GLN GLN ARG
43 LEU ILE PHE ALA GLY LYS GLN LEU GLU ASP GLY ARG THR LEU
57 SER ASP TYR ASN ILE GLN LYS GLU SER THR LEU HIS LEU VAL
71 LEU ARG LEU ARG GLY GLY

FIG. 1A

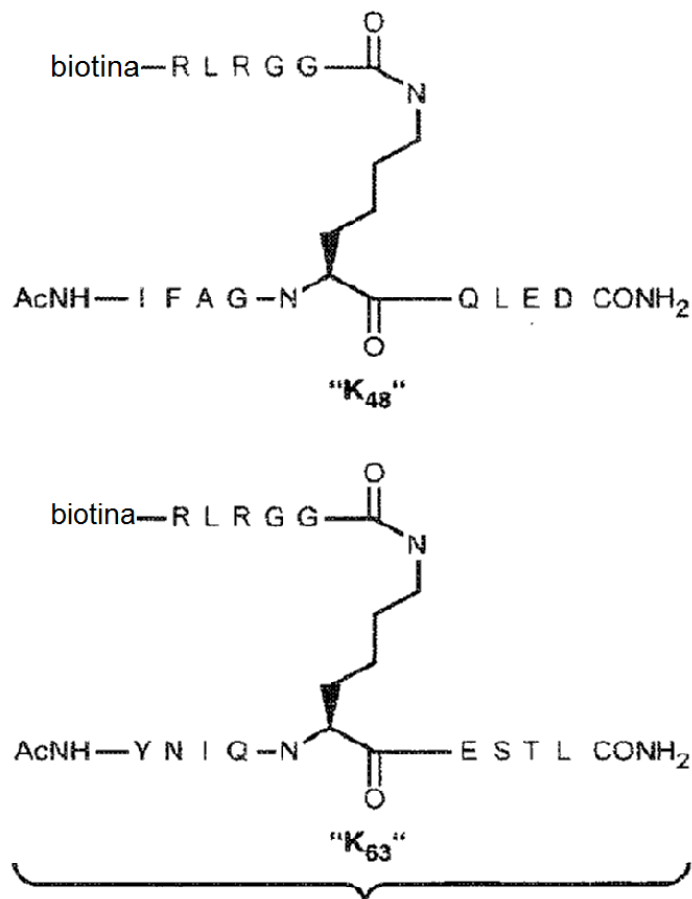


FIG. 1B

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:											Se une con
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
48-1	1	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H	48
48-2	2	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	48
48-3	3	G	F	N	I	Y	Y	S	S	I	H	48
48-4	4	G	F	N	I	S	Y	Y	Y	I	H	48
48-5	5	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	M	H	48
48-6	6	G	F	N	F	Y	S	S	Y	M	H	48
48-7	7	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H	48
48-8	8	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-9	9	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	H	48
48-10	10	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-11	11	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H	48
48-12	12	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H	48
48-13	13	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H	48
48-14	14	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H	48
48-15	15	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	48/AMBOS
48-16	16	G	F	N	F	Y	Y	Y	Y	I	H	48/AMBOS
48-17	17	G	F	N	V	S	S	Y	S	I	H	48
48-18	18	G	F	N	V	S	S	Y	S	M	H	48/AMBOS
48-19	19	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H	48/AMBOS
48-20	20	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H	TODOS
48-21	21	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H	AMBOS
48-22	22	G	F	N	V	S	Y	Y	S	I	H	AMBOS
48-23	23	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	H	AMBOS
48-24	24	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H	AMBOS
48-25	25	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H	NINGUNO/AMBOS
Consenso	26	G	F	N	L/V/ I/F	S/Y	Y/S	S/Y	S/Y	M/I	H	

FIG. 2A

HVR-H2

N° de clon	SEC ID N°:	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	Se une con
48-1	27	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-2	28	S	I	S	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-3	29	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-4	30	S	I	S	S	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-5	31	S	I	S	S	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-6	32	S	I	S	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-7	33	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-8	34	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-9	35	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-10	36	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-11	37	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-12	38	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-13	39	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-14	40	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-15	41	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48/AMBOS
48-16	42	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48/AMBOS
48-17	43	S	I	S	S	S	Y	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48
48-18	44	S	I	Y	S	S	S	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	48/AMBOS
48-19	45	S	I	Y	S	S	Y	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	48/AMBOS
48-20	46	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	TODOS
48-21	47	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	AMBOS
48-22	48	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	AMBOS
48-23	49	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	AMBOS
48-24	50	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	AMBOS
48-25	51	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	NINGUNO/AMBOS
Consenso	52	S	I	Y/S	P/S	Y/S	Y/S	S/G	Y/S	T	S/Y	Y	A	D	S	V	K	G	

FIG. 2B

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	100m	101	102	Se une con
48-1	53	G	Y	E	G	G	M	A	M												D	Y	48
48-2	54	D	G	Y	A	M	D	A	L												D	Y	48
48-3	55	L	Y	H	N	T	L	G	M												D	Y	48
48-4	56	P	Y	S	Y	S	E	A	M												D	Y	48
48-5	57	E	Y	Y	M	Y	D	A	L												D	Y	48
48-6	58	D	Y	Y	Y	I	S	A	I												D	Y	48
48-7	59	S	Y	S	Y	S	S	A	L												D	Y	48
48-8	60	G	Y	K	Y	W	S	A	F												D	Y	48
48-9	61	S	Y	S	S	Y	S	A	I												D	Y	48
48-10	62	E	G	Y	S	Q	G	G	F												D	Y	48
48-11	63	S	Y	G	Y	Y	V	A	F												D	Y	48
48-12	64	D	Y	K	F	G	Y	A	I												D	Y	48
48-13	65	E	G	Y	S	Q	G	G	F												D	Y	48
48-14	66	S	Y	S	Y	Y	S	A	M												D	Y	48
48-15	67	G	Y	M	W	Y	G	G	I												D	Y	48/AMBOS
48-16	68	E	Y	Y	S	Y	L	G	A	I											D	Y	48/AMBOS
48-17	69	H	T	K	Y	V	Y	L	Y	T	Y	W	E	D	S	M	D	Y	G	L	D	Y	48
48-18	70	S	S	I	S	E	W	Y	G	S	W	Y	Y	F	W	E	S	S	G	I	D	Y	48/AMBOS
48-19	71	E	S	Y	W	S	Y	A	M												D	Y	48/AMBOS
48-20	72	S	Y	S	Y	S	Y	G	I												D	Y	TODOS
48-21	73	S	Y	S	Y	Y	S	A	I												D	Y	AMBOS
48-22	74	S	Y	S	Y	S	Y	G	L												D	Y	AMBOS
48-23	75	G	Y	I	H	W	E	A	L												D	Y	AMBOS
48-24	76	S	Y	S	Y	S	S	G	L												D	Y	AMBOS
48-25	77	S	Y	S	Y	S	Y	G	M												D	Y	NINGUNO/AMBOS
Con-senso	78	G/D/ L/P/ E/S/ H	Y/ G/ T/S	E/Y/ H/S/ K/G/ M/I	G/A/N/ Y/M/ S/F/ W/H	G/M/T/ S/Y/I/ W/Q/ V/E	M/D/L/ E/S/G/ V/Y/W	A/G/ L/Y	M/L/ I/F/ A/Y/ G	I/T/ S/ n.p.	Y/I W/ n.p.	W/ Y/ n.p.	E/ Y/ n.p.	D/ F/ n.p.	S/ W/ n.p.	M/ E/ n.p.	D/ S/ n.p.	Y/ S/ n.p.	G/ n.p.	L/I/ n.p.	D	Y	

FIG. 2C

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	100m	101	102	Se une con
63-1	101	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I											D	Y	63/AMBOS
63-2	102	E	K	M	Y	Y	S	Y	G	F											D	Y	TODOS
63-3	103	E	S	Y	S	I	H	F	G	F											D	Y	AMBOS
63-4	104	M	Y	Y	S	Y	Y	W	R	P	Y	G	N	A	I						D	Y	63/AMBOS
63-5	105	G	S	I	P	S	Y	W	S	A	D	W	Y	Y	Y	Y	G	L			D	Y	AMBOS
63-6	106	Y	K	Y	N	Y	Y	Y	F	E	S	G	M								D	Y	TODOS
63-7	107	E	Y	Y	W	W	Y	K	E	A	W	Y	S	A	G						D	Y	AMBOS
63-8	108	G	I	M	F	S	S	W	W	W	Y	Y	D	Y	S		A	L			D	Y	TODOS
63-9	109	S	G	Y	Y	Y	Q	G	Y	W	W	Y	Y	Y	T	G	Y	Y	G	M	D	Y	TODOS
Con-senso	110	E/M/ G/Y/ S	Y/K/ S/I/ G	Y/M/ I	R/Y/S/ P/N/ W/F	W/Y/ I/S	Y/S/ H/Q	T/Y/ F/W/ K/G	A/G/ R/S/ F/E/ W/Y	I/F P/A/ E/W	Y/D S/W/ n.p.	GW/ Y/ n.p.	N/Y/ M/S/ D/ n.p.	A/Y/ n.p.	I/Y/ G/S/ T/ n.p.	Y/M/ D/G/ n.p.	G/A/ Y/ n.p.	L/Y/ n.p.	G/ n.p.	M/ n.p.	D	Y	

FIG. 3B

I	A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	RVTIT
	B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
	C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
	D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
II	A	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	RVTIS
	B	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
	C	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
	D	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
Aceptor						
Segundo aceptor	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS

FIG. 4A

I				
A	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
B	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
C	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
D	ADTSTSTAYMELSSLSRSED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
II				
A	VDTSKNQFSLKLSSVTAAD	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
B	VDTSKNQFSLKLSSVTAAD	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
C	VDTSKNQFSLKLSSVTAAD	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
D	VDTSKNQFSLKLSSVTAAD	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
III				
A	RDNSKNTLYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
B	RDNSKNTLYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
C	RDNSKNTLYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
D	RDNSKNTLYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
Aceptor				
A	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYQSR	-H3-	WGQGLVTVSS
B	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYQSR	-H3-	WGQGLVTVSS
C	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYQSR	-H3-	WGQGLVTVSS
Segundo aceptor				
A	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
B	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
C	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS
D	ADTSKNTAYLQMNLSLRAED	AVVYCAR	-H3-	WGQGLVTVSS

FIG. 4B

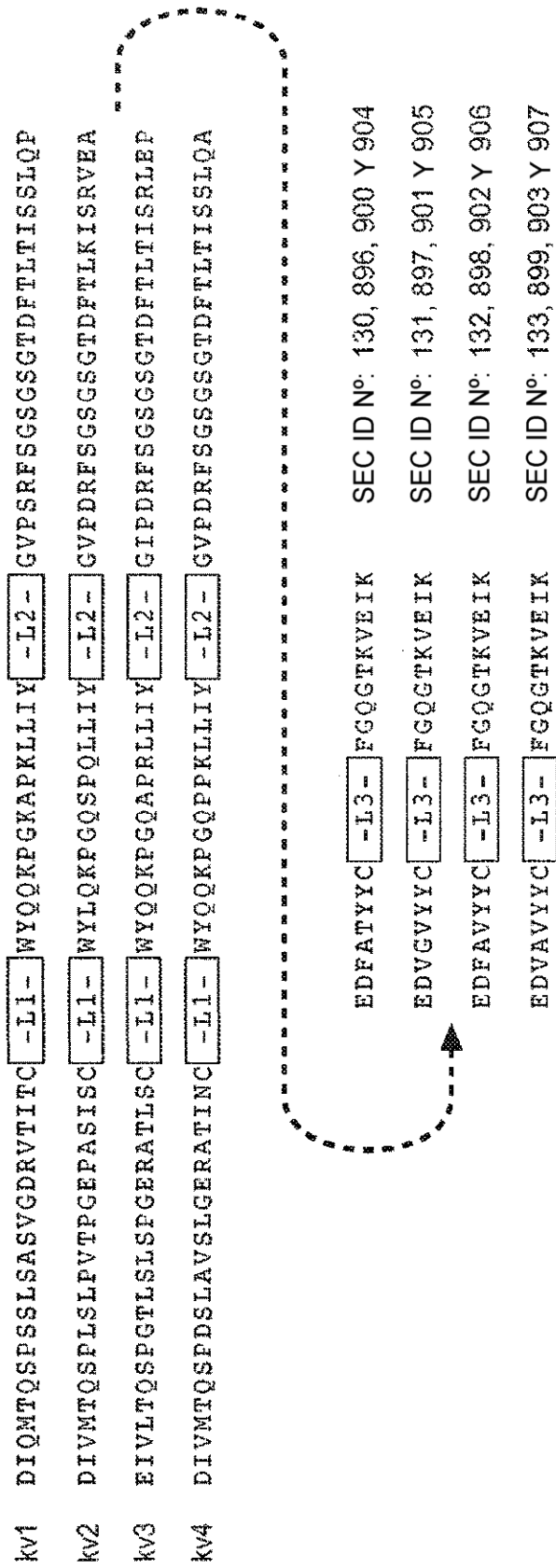


FIG. 5

Secuencias marco conservadas de cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID N°: 134)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID N°: 135)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID N°: 136)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 137)

Secuencias marco conservadas de cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID N°: 138)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID N°: 139)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEC ID N°: 140)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID N°: 141)

FIG. 6**Secuencias marco conservadas de cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 y 99 (subrayado)**

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEC ID N°: 142)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEC ID N°: 143)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEC ID N°: 144)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Arg Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEC ID N°: 145)

Secuencias marco conservadas de cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayado)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEC ID N°: 146)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEC ID N°: 147)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
Cys⁹² (SEC ID N°: 148)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEC ID N°: 149)

FIG. 7

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
48-26	151	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
48-27	152	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H
48-28	153	G	F	N	F	S	Y	Y	S	M	H
48-29	154	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H
48-30	155	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-31	156	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
48-32	157	G	F	N	L	S	Y	S	Y	I	H
48-33	158	G	F	N	F	Y	Y	Y	Y	I	H
48-34	159	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	H
48-35	160	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H
48-36	161	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H
48-37	162	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
48-38	163	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	I	H
48-39	164	G	F	N	L	S	Y	S	S	I	H
48-40	165	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	H
48-41	166	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H
48-42	167	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	M	H
48-43	168	G	F	N	I	S	Y	S	Y	M	H
48-44	169	G	F	N	I	S	Y	S	S	I	H
48-45	170	G	F	N	V	S	Y	S	S	M	H
48-46	171	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H
48-47	172	G	F	N	V	S	Y	Y	S	I	H
48-48	173	G	F	N	I	S	Y	S	S	I	H
48-49	174	G	F	N	F	S	Y	Y	S	I	H
48-50	175	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H
Consenso	176	G	F	N	V/F/ L/I	Y/S	Y	S/Y	S/Y	I/M	H

FIG. 8A

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																		
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
48-26	177	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-27	178	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-28	179	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
48-29	180	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-30	181	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-31	182	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-32	183	S	I	S	S	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-33	184	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-34	185	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-35	186	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-36	187	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-37	188	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-38	189	S	I	S	S	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-39	190	S	I	Y	S	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-40	191	S	I	S	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-41	192	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-42	193	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-43	194	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-44	195	S	I	S	S	S	Y	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
48-45	196	S	I	S	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-46	197	S	I	Y	S	S	Y	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
48-47	198	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-48	199	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
48-49	200	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
48-50	201	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G	
Consenso	202	S	I	S/Y	P/S	Y/S	Y	S/G	Y/S	T	S/Y	Y	A	D	S	V	K	G	

FIG. 8B

HVR-H3

N° de clon	SEC ID N°:											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
48-26	203	E	G	Y	S	Q	G	G	F		D	Y
48-27	204	S	Y	S	Y	Y	S	A	I		D	Y
48-28	205	S	Y	S	Y	S	Y	G	M		D	Y
48-29	206	S	Y	S	Y	S	Y	G	I		D	Y
48-30	207	S	Y	S	Y	Y	S	A	M		D	Y
48-31	208	G	Y	K	Y	W	S	A	F		D	Y
48-32	209	E	S	F	Y	Y	S	P	A	F	D	Y
48-33	210	E	Y	Y	S	Y	L	G	A	I	D	Y
48-34	211	G	Y	E	G	G	M	A	M		D	Y
48-35	212	S	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
48-36	213	G	Y	M	W	Y	G	G	I		D	Y
48-37	214	D	C	Y	Y	x	A	A	F		D	Y
48-38	215	E	N	Y	W	W	A	I			D	Y
48-39	216	S	Y	S	Y	Y	S	A	F		D	Y
48-40	217	D	Y	Y	F	F	S	A	I		D	Y
48-41	218	S	Y	S	Y	S	S	A	L		D	Y
48-42	219	E	G	Y	I	S	G	D	A	I	D	Y
48-43	220	S	Y	S	S	Y	S	A	I		D	Y
48-44	221	G	Y	F	E	G	W	Y	G	L	D	Y
48-45	222	E	Y	S	Y	Y	G	G	F		D	Y
48-46	223	E	S	Y	W	S	Y	A	M		D	Y
48-47	224	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
48-48	225	Y	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
48-49	226	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
48-50	227	S	Y	S	Y	S	Y	G	M		D	Y
Con-senso	228	E/S/ G/D/ Y	G/Y/ S/C/ N	Y/S/ K/F/ E/M	S/Y/ G/W/ F/I/E	Q/Y/ S/W/ G/X/ F	G/S/ Y/L/ M/G/ A/W	G/A P/I/ D/Y	F/I/ M/A/ L/G/ n.p.	F/I/ L/ n.p.	D	Y

FIG. 8C

FIG. 9A

HVR-H1[illegible]

24-BAH

Nº de clon	SEC ID Nº:																			
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65		
63-10	241	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-11	242	S	I	Y	P	S	S	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G		
63-12	243	S	I	Y	S	S	Y	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-13	244	S	I	S	S	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-14	245	S	I	Y	S	S	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-15	246	S	I	S	P	S	Y	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G		
63-16	247	Y	I	S	P	S	Y	S	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G		
63-17	248	S	I	S	S	S	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-18	249	S	I	Y	S	S	Y	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G		
63-19	250	Y	I	S	S	Y	S	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G		
63-20	251	S	I	Y	P	S	S	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G		
Consenso	252	Y/S	I	S/Y	P/S	Y/S	Y/S	G/S	S/Y	T	S/Y	Y	A	D	S	V	K	G		

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu01	265	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu02	266	G	F	N	V	S	Y	S	Y	M	H
apu03	267	G	F	N	F	S	Y	Y	S	M	H
apu04	268	G	F	N	L	S	Y	Y	S	I	H
apu05	269	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu06	270	G	F	N	V	Y	Y	S	S	I	H
apu07	271	G	F	N	L	S	Y	S	Y	I	H
apu08	272	G	F	N	L	S	Y	S	S	M	H
apu09	273	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H
apu10	274	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H
apu11	275	G	F	N	V	S	Y	Y	Y	I	H
apu12	276	G	F	N	L	Y	Y	S	Y	M	H
apu13	277	G	F	N	V	S	Y	Y	S	I	H
apu14	278	G	F	N	I	S	Y	S	S	I	H
apu15	279	G	F	N	F	S	Y	Y	S	I	H
Consenso	280	G	F	N	V/F/L/I	Y/S	Y	S/Y	S/Y	I/M	H

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu01	281	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu02	282	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu03	283	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
apu04	284	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu05	285	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu06	286	S	I	Y	P	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu07	287	S	I	S	S	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu08	288	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu09	289	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu10	290	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu11	291	S	I	S	S	Y	Y	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu12	292	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu13	293	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu14	294	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu15	295	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G
Consenso	296	S	I	S/Y	P/S	Y	Y	S/G	Y/S	T	S/Y	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 10A

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
apu01	297	E	G	Y	S	Q	G	G	F		D	Y
apu02	298	S	Y	S	Y	Y	S	A	I		D	Y
apu03	299	S	Y	S	Y	S	Y	G	M		D	Y
apu04	300	S	Y	S	Y	S	Y	G	I		D	Y
apu05	301	S	Y	S	Y	Y	S	A	M		D	Y
apu06	302	G	Y	K	Y	W	S	A	F		D	Y
apu07	303	E	S	F	Y	Y	S	P	A	F	D	Y
apu08	304	G	Y	E	G	G	M	A	M		D	Y
apu09	305	S	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
apu10	306	G	Y	M	W	Y	G	G	I		D	Y
apu11	307	E	N	Y	W	W	A	I			D	Y
apu12	308	S	Y	S	Y	S	S	A	L		D	Y
apu13	309	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
apu14	310	Y	Y	S	Y	S	S	G	L		D	Y
apu15	311	S	Y	S	Y	S	Y	G	L		D	Y
Con-senso	312	E/S/ G/Y	G/Y/ S/N	Y/S/ K/F/E	S/Y/ G/W	Q/Y/ S/G	G/S/ Y/M/ A	G/A/ P/I	F/I/ M/A/ L/n.p.	F/ n.p.	D	Y

FIG. 10B**HVR-L3**

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
apu01	313	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		F	T
apu02	314	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		F	T
apu03	315	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	P	I	T
apu04	316	Q	Q	Y	S	S	Y	Y	S	P	V	T
apu05	317	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		I	T
apu06	318	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		V	T
apu07	319	Q	Q	S	Y	Y	Y	S	L		F	T
apu08	320	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		V	T
apu09	321	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		F	T
apu10	322	Q	Q	Y	S	Y	S	S	L		F	T
apu11	323	Q	Q	S	Y	Y	Y	Y	P		I	T
apu12	324	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		V	T
apu13	325	Q	Q	Y	S	S	S	Y	Y	P	F	T
apu14	326	Q	Q	S	S	Y	S	S	L		L	T
apu15	327	Q	Q	Y	Y	Y	Y	Y	Y	P	I	T
Con-senso	328	Q	Q	S/Y	S/Y	Y/S	S/Y	S/Y	L/S/ P/Y	P/ n.p.	F/I/ V/L	T

FIG. 10C

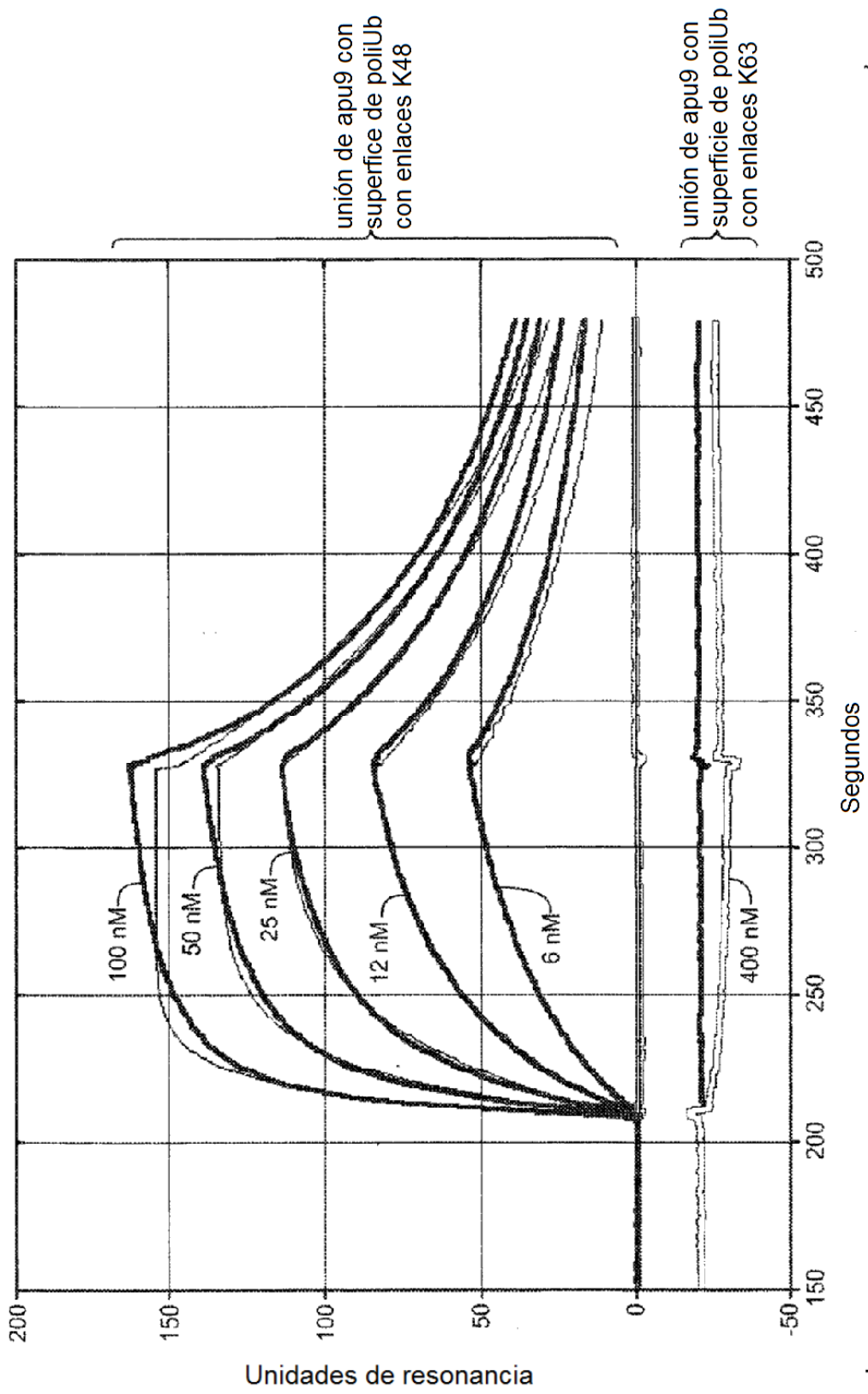
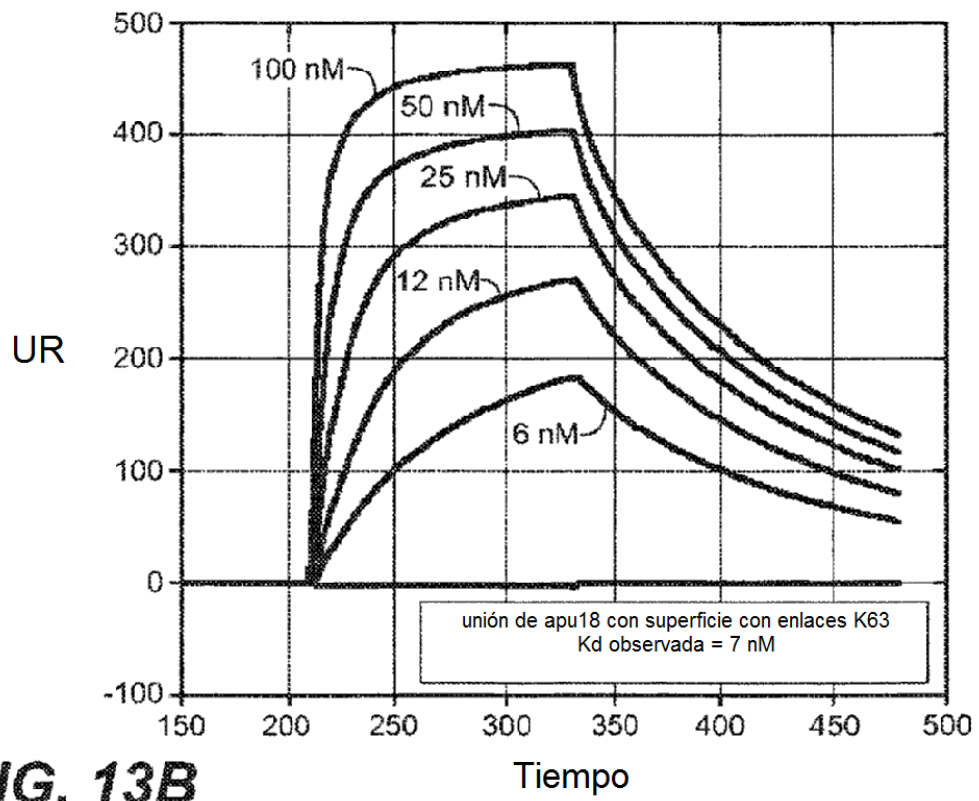
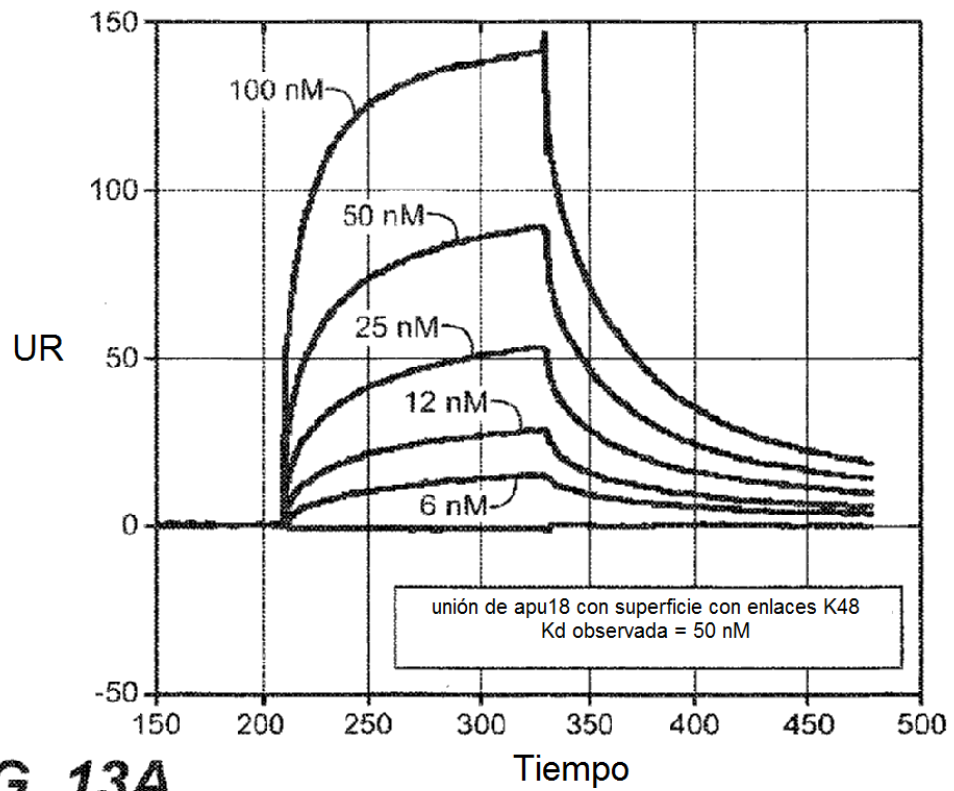


FIG. 12



HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
48-51	392	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-52	393	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-53	394	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-54	395	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-55	396	G	F	N	I	G	Y	S	F	M	H
48-56	397	G	F	N	V	D	Y	S	Y	M	H
48-57	398	G	F	N	V	D	Y	S	Y	M	H
48-58	399	G	F	N	F	S	Y	S	F	M	H
48-59	400	G	F	N	I	V	Y	S	F	M	H
48-60	401	G	F	N	I	I	Y	S	F	M	H
48-61	402	G	F	N	I	V	Y	S	F	I	H
48-62	403	G	F	N	L	S	Y	S	F	M	H
48-63	404	G	F	N	V	D	Y	S	F	M	H
48-64	405	G	F	N	V	I	Y	S	F	M	H
48-65	406	G	F	N	V	A	Y	S	L	M	H
48-66	407	G	F	N	I	S	Y	S	W	M	H
48-67	408	G	F	N	L	D	Y	S	F	M	H
48-68	409	G	F	N	F	L	Y	S	G	I	H
48-69	410	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-70	411	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-71	412	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-72	413	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-73	414	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-74	415	G	F	N	I	L	Y	S	G	I	H
48-75	416	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-76	417	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-77	418	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-78	419	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-79	420	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-80	421	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-81	422	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-82	423	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-83	424	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-84	425	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-85	426	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-86	427	G	F	N	I	F	Y	S	G	I	H
48-87	428	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-88	429	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-89	430	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-90	431	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-91	432	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-92	433	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-93	434	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-94	435	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-95	436	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-96	437	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H

FIG. 14A

HVR-H1 (Continuación)

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
48-97	438	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-98	439	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-99	440	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-100	441	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-101	442	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-102	443	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-103	444	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-104	445	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-105	446	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-106	447	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-107	448	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-108	449	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-109	450	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-110	451	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-111	452	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
48-112	453	G	F	N	L	S	Y	S	G	M	H
48-113	454	G	F	N	L	L	Y	S	G	M	H
48-114	455	G	F	N	V	A	Y	S	G	I	H
48-115	456	G	F	N	V	D	Y	S	G	M	H
48-116	457	G	F	N	V	D	Y	S	G	M	H
48-117	458	G	F	N	V	S	Y	S	S	I	H
48-118	459	G	F	N	V	V	Y	S	G	I	H
Consenso	460	G	F	N	I/V/ F/L	S/G/ D/V/ I/L/ F/A	Y	S	S/F/ Y/L/ W/G	M/I	H

FIG. 14B

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
48-51	461	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-52	462	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-53	463	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-54	464	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-55	465	S	I	A	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-56	466	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-57	467	S	I	A	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-58	468	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-59	469	S	I	S	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-60	470	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-61	471	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-62	472	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-63	473	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-64	474	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-65	475	S	I	S	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-66	476	S	I	T	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-67	477	S	I	T	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-68	478	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-69	479	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-70	480	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-71	481	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-72	482	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-73	483	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-74	484	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-75	485	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-76	486	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-77	487	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-78	488	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-79	489	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-80	490	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-81	491	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-82	492	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-83	493	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-84	494	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-85	495	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-86	496	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-87	497	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-88	498	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-89	499	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-90	500	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-91	501	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-92	502	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-93	503	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 14C

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
48-94	504	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-95	505	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-96	506	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-97	507	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-98	508	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-99	509	S	I	Y	P	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-100	510	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-101	511	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-102	512	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-103	513	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-104	514	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-105	515	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-106	516	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-107	517	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-108	518	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-109	519	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-110	520	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-111	521	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-112	522	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-113	523	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-114	524	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-115	525	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-116	526	S	I	Y	S	Y	Y	T	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-117	527	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
48-118	528	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
Con-senso	529	S	I	Y/A/ S/T	S/P	Y	Y	S/T	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 14D

HVR-H3

N° de clon	SEC ID N°:										
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102
48-51	530	S	Y	N	N	T	T	S	I	D	Y
48-52	531	G	Y	S	W	Y	N	A	M	D	Y
48-53	532	G	Y	S	W	F	N	A	I	D	Y
48-54	533	G	Y	Y	W	F	D	A	M	D	Y
48-55	534	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-56	535	S	Y	S	Y	R	E	T	M	D	Y
48-57	536	S	Y	S	Y	R	E	T	M	D	Y
48-58	537	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-59	538	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-60	539	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-61	540	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-62	541	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-63	542	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-64	543	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-65	544	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-66	545	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-67	546	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-68	547	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-69	548	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-70	549	S	Y	S	Y	S	F	G	M	D	Y
48-71	550	S	Y	S	Y	F	M	G	M	D	Y
48-72	551	S	Y	S	Y	H	V	A	F	D	Y
48-73	552	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-74	553	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-75	554	S	Y	S	Y	H	L	A	F	D	Y
48-76	555	S	Y	S	Y	S	L	A	F	D	Y
48-77	556	S	Y	S	Y	Y	I	A	M	D	Y
48-78	557	S	Y	S	Y	Y	M	G	M	D	Y
48-79	558	S	Y	S	Y	S	M	G	M	D	Y
48-80	559	S	Y	S	Y	H	V	A	M	D	Y
48-81	560	S	Y	S	Y	H	M	G	M	D	Y
48-82	561	S	Y	S	Y	H	L	G	M	D	Y
48-83	562	S	Y	S	Y	Y	Q	G	F	D	Y
48-84	563	S	Y	S	Y	S	M	G	M	D	Y
48-85	564	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-86	565	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-87	566	S	Y	S	Y	S	E	A	L	D	Y
48-88	567	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-89	568	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-90	569	S	Y	S	Y	F	M	G	M	D	Y
48-91	570	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-92	571	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
48-93	572	S	Y	S	Y	Y	L	A	M	D	Y
48-94	573	S	Y	S	Y	F	I	G	M	D	Y
48-95	574	S	Y	S	Y	H	L	G	M	D	Y

FIG. 14E

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102
48-96	575	S	Y	S	Y	T	E	A	F	D	Y
48-97	576	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-98	577	S	Y	S	Y	T	Y	G	L	D	Y
48-99	578	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-100	579	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-101	580	S	Y	S	Y	W	V	G	M	D	Y
48-102	581	S	Y	S	Y	T	L	A	M	D	Y
48-103	582	S	Y	S	Y	T	M	G	L	D	Y
48-104	583	S	Y	S	Y	F	L	G	M	D	Y
48-105	584	S	Y	S	Y	H	M	G	F	D	Y
48-106	585	S	Y	S	Y	S	L	G	M	D	Y
48-107	586	S	Y	S	Y	Y	E	A	F	D	Y
48-108	587	S	Y	S	Y	R	M	A	F	D	Y
48-109	588	S	Y	S	Y	H	I	A	F	D	Y
48-110	589	S	Y	S	Y	S	V	G	M	D	Y
48-111	590	S	Y	S	Y	T	L	G	M	D	Y
48-112	591	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-113	592	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-114	593	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-115	594	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-116	595	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-117	596	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
48-118	597	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
Consenso	598	S/G	Y	S/N/Y	Y/N/ W	T/Y/ F/R/ S/H/ W	T/N/ D/S/ E/F/ M/Y/ L/I/Y	S/A/ T/G	I/M/ F/L	D	Y

FIG. 14F

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
63-21	599	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-22	600	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-23	601	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-24	602	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-25	603	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-26	604	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-27	605	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-28	606	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-29	607	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-30	608	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-31	609	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-32	610	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-33	611	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-34	612	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-35	613	G	F	N	F	S	S	S	Y	I	H
63-36	614	G	F	N	I	K	G	S	L	I	H
63-37	615	G	F	N	I	K	G	S	I	M	H
63-38	616	G	F	N	I	K	S	S	I	M	H
63-39	617	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-40	618	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-41	619	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-42	620	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-43	621	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-44	622	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-45	623	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-46	624	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
63-47	625	G	F	N	L	A	S	S	F	M	H
63-48	626	G	F	N	L	V	S	S	L	M	H
63-49	627	G	F	N	V	K	T	G	L	I	H
63-50	628	G	F	N	V	K	W	N	Y	I	H
63-51	629	G	F	N	V	V	S	S	F	I	H
Consenso	630	G	F	N	I/F/ LV	S/K/ AV	S/G/ TW	S/G/N	Y/L/ IF	I/M	H

FIG. 15A

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
63-21	631	A	I	A	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-22	632	A	I	P	P	F	Y	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-23	633	A	I	Q	P	Y	F	G	W	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
63-24	634	A	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-25	635	D	I	A	P	Y	L	G	T	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
63-26	636	D	I	S	P	W	Y	G	G	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-27	637	D	I	S	S	Y	T	G	S	T	D	Y	A	D	S	V	K	G
63-28	638	F	I	Q	P	Y	Y	G	S	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
63-29	639	F	I	S	P	Y	L	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
63-30	640	G	I	T	P	Y	L	G	W	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-31	641	H	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-32	642	I	I	S	P	Y	L	G	S	T	G	Y	A	D	S	V	K	G
63-33	643	S	I	T	P	Y	Y	G	W	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
63-34	644	W	I	S	P	Y	L	G	R	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-35	645	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-36	646	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-37	647	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-38	648	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-39	649	Y	I	G	P	F	T	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
63-40	650	Y	I	S	P	F	L	S	T	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-41	651	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-42	652	Y	I	S	P	Y	S	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
63-43	653	Y	I	S	P	Y	Y	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-44	654	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-45	655	Y	I	S	P	Y	L	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-46	656	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-47	657	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-48	658	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-49	659	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-50	660	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
63-51	661	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
Con-senso	662	A/D/ F/G/ H/I/ S/W/ Y	I	A/P/ Q/S/ T/G	P/S	Y/F	L/Y/ F/T	G/S	S/ W/T/ G/R	T	S/I/ K/D/ N/G/ R	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 15B

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
63-21	663	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-22	664	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-23	665	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-24	666	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-25	667	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-26	668	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-27	669	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-28	670	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-29	671	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-30	672	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-31	673	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-32	674	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-33	675	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-34	676	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-35	677	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-36	678	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-37	679	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-38	680	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-39	681	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-40	682	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-41	683	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-42	684	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-43	685	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-44	686	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-45	687	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-46	688	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-47	689	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-48	690	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-49	691	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-50	692	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
63-51	693	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
Consenso	694	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y

FIG. 15C

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu2.01	695	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.02	696	G	F	N	I	F	Y	G	G	I	H
apu2.03	697	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.04	698	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.05	699	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.06	700	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.07	701	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.08	702	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.09	703	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
apu2.10	704	G	F	N	I	S	Y	S	S	M	H
Consenso	705	G	F	N	I	S/F	Y	S/G	S/G	M/I	H

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu2.01	706	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.02	707	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.03	708	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.04	709	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.05	710	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.06	711	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.07	712	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.08	713	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.09	714	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.10	715	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
Consenso	716	S	I	Y	S	Y	Y	S	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	101	102
apu2.01	717	S	Y	S	Y	S	E	A	L	D	Y
apu2.02	718	S	Y	S	Y	Y	S	A	M	D	Y
apu2.03	719	S	Y	S	Y	S	L	A	F	D	Y
apu2.04	720	S	Y	S	Y	S	F	G	M	D	Y
apu2.05	721	S	Y	S	Y	R	M	A	F	D	Y
apu2.06	722	G	Y	S	W	F	N	A	I	D	Y
apu2.07	723	S	Y	S	Y	H	L	G	M	D	Y
apu2.08	724	S	Y	S	Y	S	V	G	M	D	Y
apu2.09	725	S	Y	S	Y	H	V	A	F	D	Y
apu2.10	726	S	Y	S	Y	F	L	A	M	D	Y
Consenso	727	S/G	Y	S	Y/W	S/Y/ R/F/H	E/S/L/ F/M/N/V	A/G	L/M/ F/I	D	Y

FIG. 16A

HVR-L3

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97
apu2.01	728	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.02	729	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.03	730	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.04	731	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.05	732	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.06	733	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.07	734	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.08	735	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.09	736	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
apu2.10	737	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T
Con-senso	738	Q	Q	S	S	Y	S	S	L	I	T

FIG. 16B

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:										
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
apu2.11	739	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
apu2.12	740	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
apu2.13	741	G	F	N	V	K	W	N	Y	I	H
apu2.14	742	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
apu2.15	743	G	F	N	I	K	G	S	I	M	H
apu2.16	744	G	F	N	V	K	T	G	L	I	H
apu2.17	745	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
apu2.18	746	G	F	N	L	V	S	S	L	M	H
apu2.19	747	G	F	N	V	V	S	S	F	I	H
apu2.20	748	G	F	N	I	S	S	S	Y	I	H
Consenso	749	G	F	N	I/V/L	S/K/V	S/W/G/T	S/N/G	Y/I/L/F	I/M	H

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu2.11	750	Y	I	S	P	Y	L	S	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.12	751	F	I	S	P	Y	L	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.13	752	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.14	753	D	I	A	P	Y	L	G	T	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.15	754	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.16	755	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.17	756	H	I	S	P	Y	L	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.18	757	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.19	758	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu2.20	759	A	I	Q	P	Y	F	G	W	T	I	Y	A	D	S	V	K	G
Consenso	760	Y/F/ D/H/ A	I	S/A/ Q	P	Y	L/Y/ F	S/ G	S/T/ W	T	S/N/ K/I	Y	A	D	S	V	K	G

HVR-H3

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
apu2.11	761	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.12	762	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.13	763	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.14	764	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.15	765	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.16	766	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.17	767	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.18	768	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.19	769	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu2.20	770	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
Consenso	771	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y

FIG. 17A

HVR-L3

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		89	90	91	92	93	94	95	95a	95b	96	97
apu2.11	772	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.12	773	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.13	774	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.14	775	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.15	776	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.16	777	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.17	778	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.18	779	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.19	780	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
apu2.20	781	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T
Con-senso	782	Q	Q	Y	S	S	Y	S	S	L	F	T

FIG. 17B

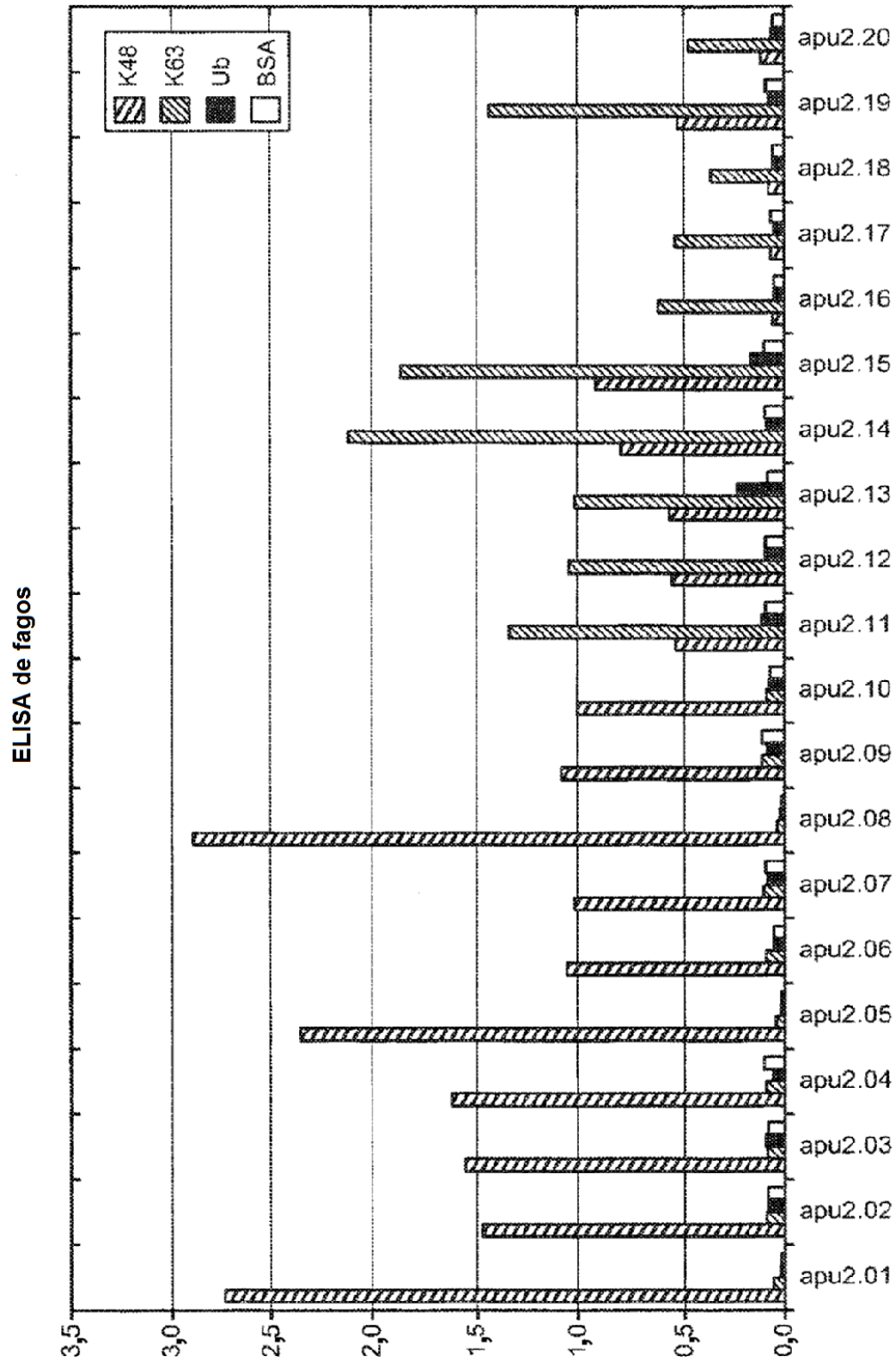
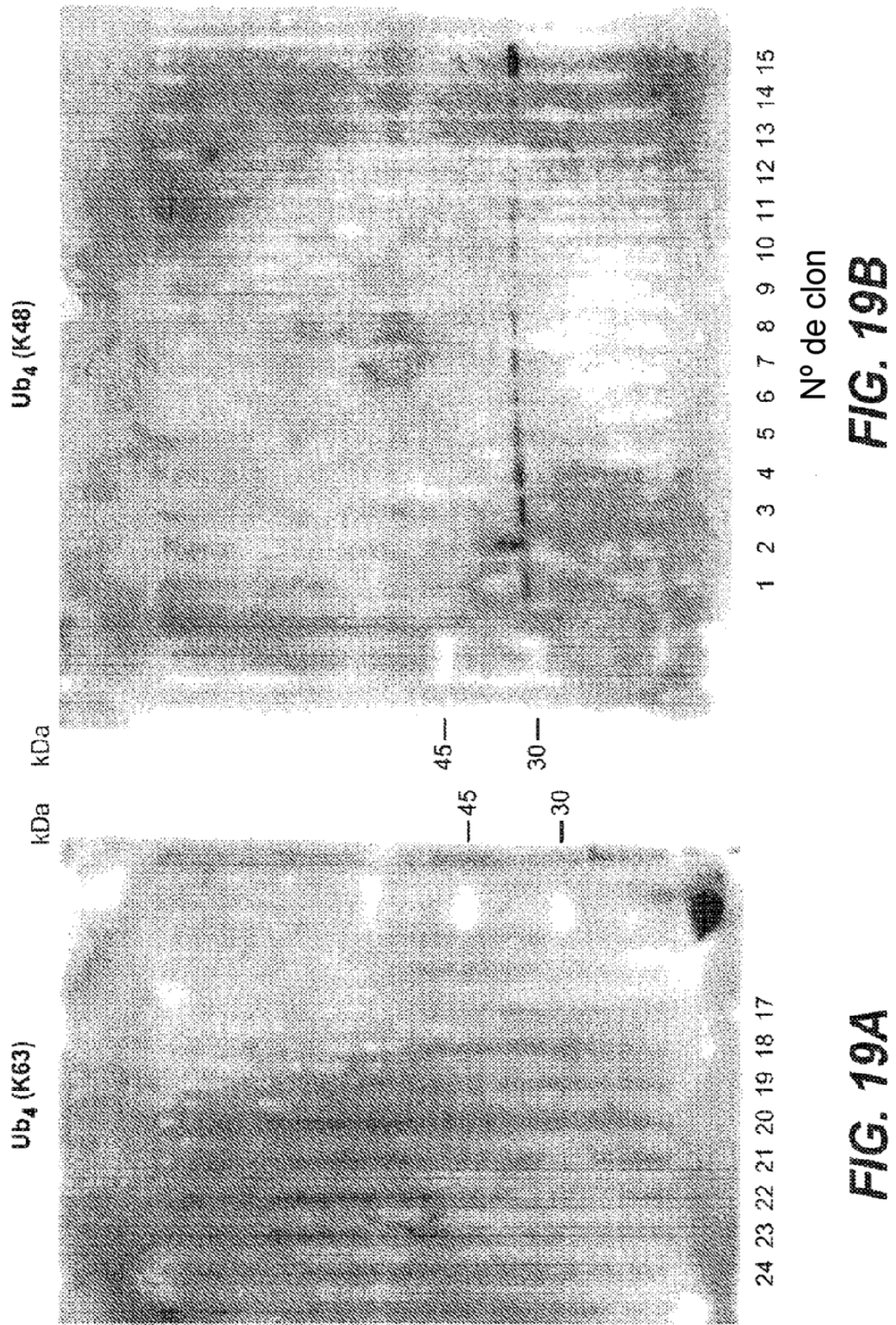


FIG. 18



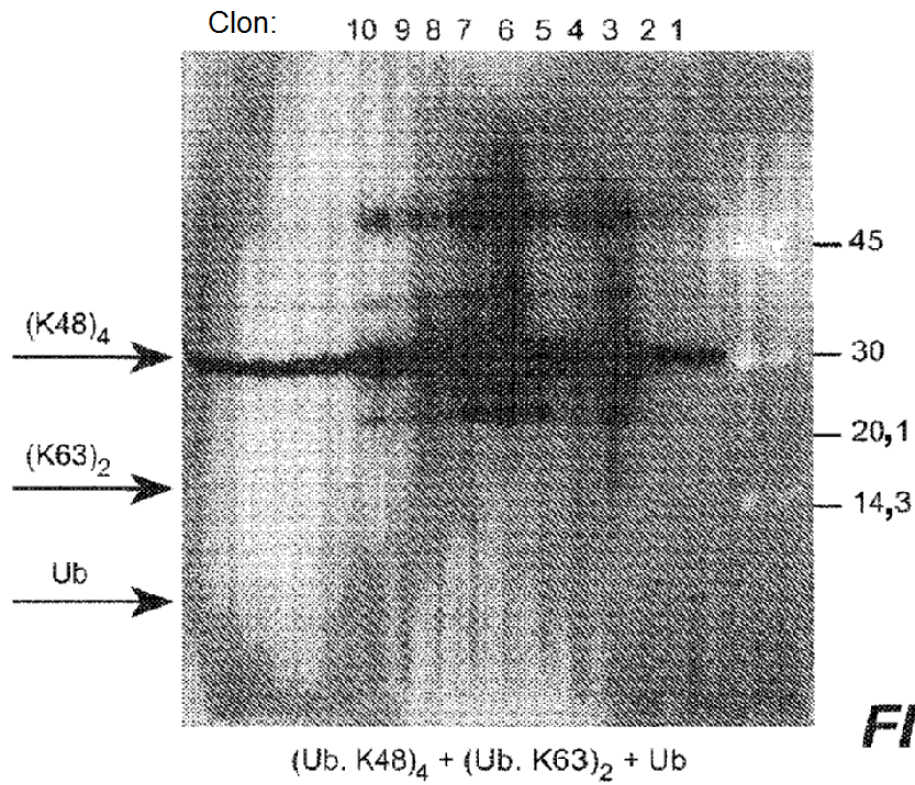


FIG. 20A

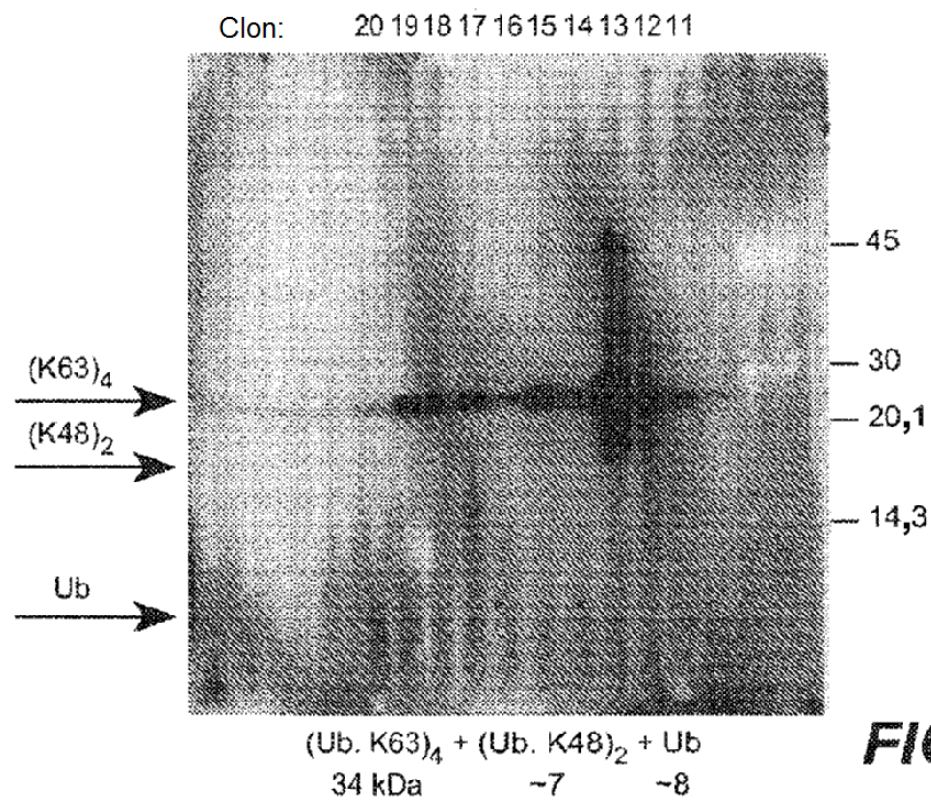


FIG. 20B

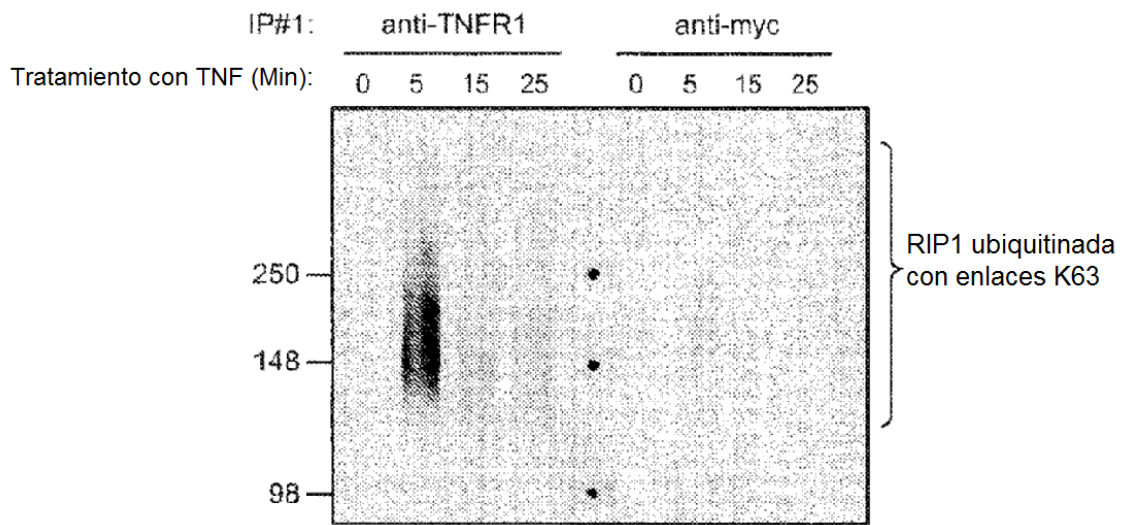


FIG. 21A

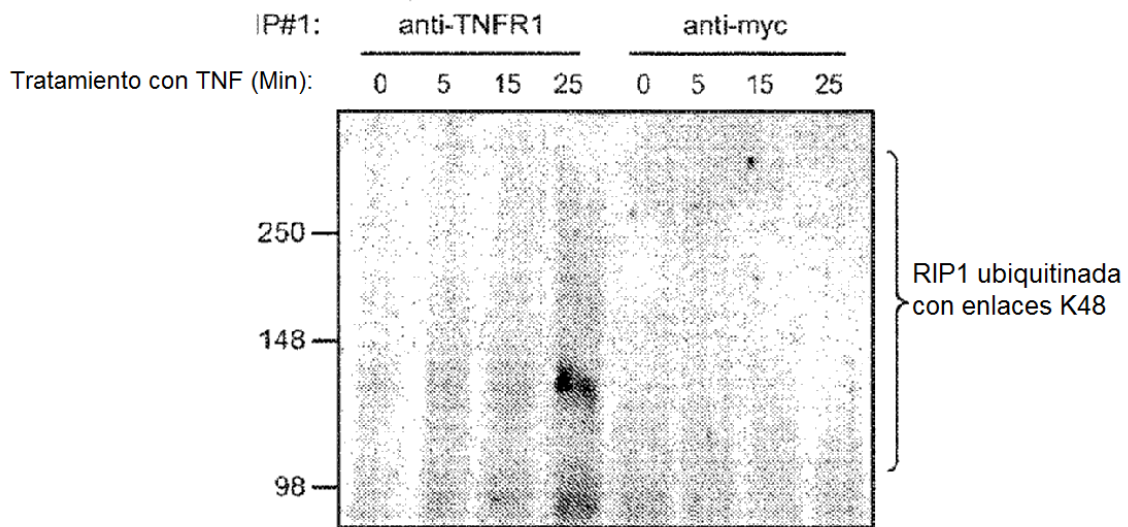


FIG. 21B

ELISA de fagos antipoliubiquitina de 3ª generación

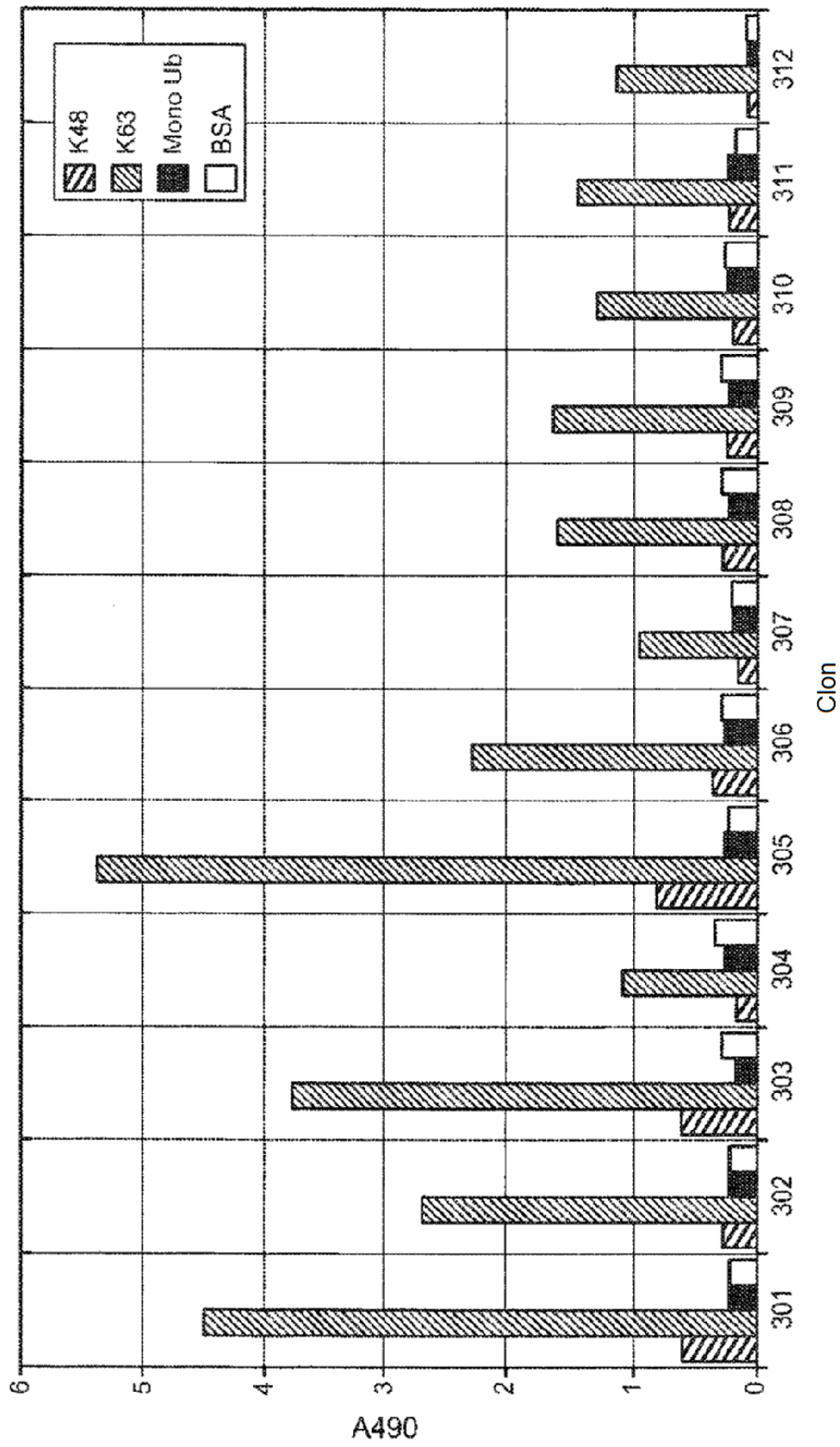


FIG. 22

HVR-H1

Nº de clon	SEC ID Nº:											
		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
apu3.01	789	G	F	N	V	K	T	G	F	M	H	
apu3.02	790	G	F	N	V	K	T	G	F	I	H	
apu3.03	791	G	F	N	I	K	M	V	F	M	H	
apu3.04	792	G	F	N	V	K	N	F	I	I	H	
apu3.05	793	G	F	N	V	K	T	G	F	M	H	
apu3.06	794	G	F	N	V	K	R	G	F	M	H	
apu3.07	795	G	F	N	L	K	T	G	F	I	H	
apu3.08	796	G	F	N	V	K	T	G	Y	M	H	
apu3.09	797	G	F	N	V	K	T	G	L	I	H	
apu3.10	798	G	F	N	V	M	I	G	I	I	H	
apu3.11	799	G	F	N	I	K	T	G	F	M	H	
apu3.12	ND											
Consenso	800	G	F	N	V/I/L	K/M	T/M/ N/R/I	G/V/ F	F/I/ Y/L	M/I	H	

HVR-H2

Nº de clon	SEC ID Nº:																	
		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
apu3.01	801	Y	I	S	P	Y	Y	G	W	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.02	802	Y	I	S	P	Y	L	G	V	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.03	803	Y	I	S	P	Y	D	G	S	T	N	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.04	804	Y	I	I	P	Y	S	G	N	T	V	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.05	805	Y	I	S	P	Y	S	G	R	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.06	806	Y	I	S	P	Y	L	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.07	807	Y	I	S	P	Y	W	G	S	T	T	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.08	808	Y	I	S	P	Y	Y	G	S	T	R	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.09	809	Y	I	S	P	Y	F	G	Y	T	S	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.10	810	Y	I	I	P	Y	S	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.11	811	Y	I	T	P	Y	W	G	S	T	K	Y	A	D	S	V	K	G
apu3.12	ND																	
Consenso	812	Y	I	S/I/T	P	Y	Y/L/ D/S/ W	G	W/V/ S/N/ R/Y	T	R/N/ V/I/ S/K	Y	A	D	S	V	K	G

FIG. 23A

HVR-H3

N° de clon	SEC ID N°:											
		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102
apu3.01	813	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.02	814	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.03	815	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.04	816	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.05	817	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.06	818	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.07	819	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.08	820	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.09	821	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.10	822	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.11	823	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y
apu3.12	ND											
Con-senso	824	E	Y	Y	R	W	Y	T	A	I	D	Y

FIG. 23B

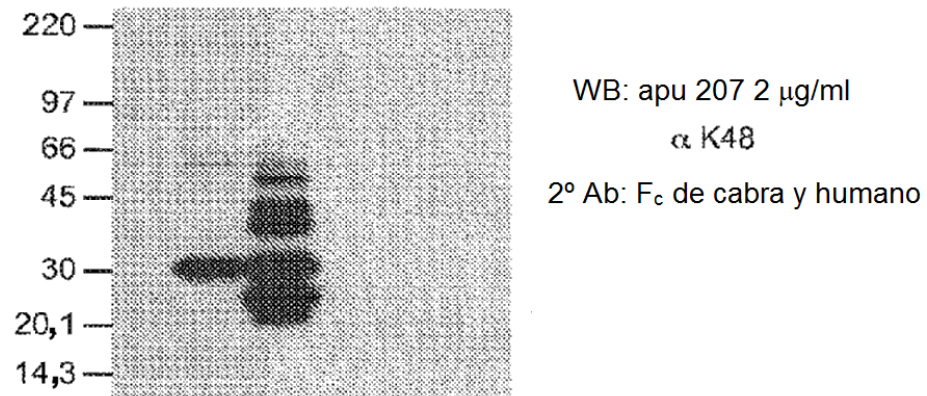


FIG. 24A

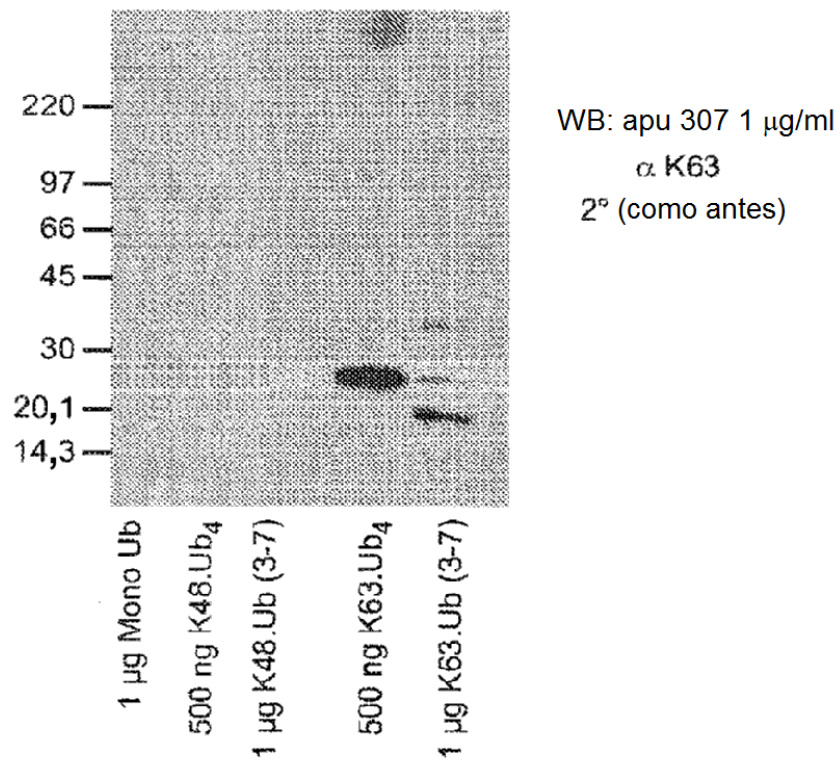


FIG. 24B

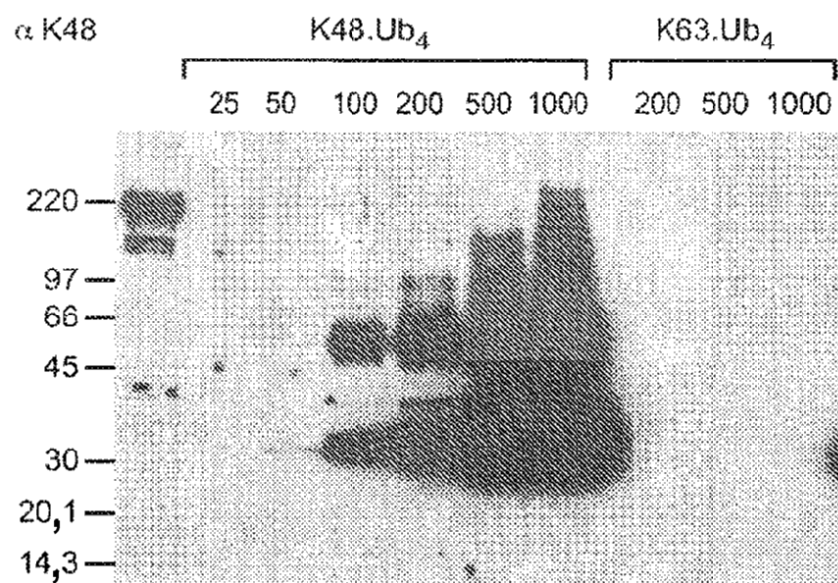


FIG. 24C

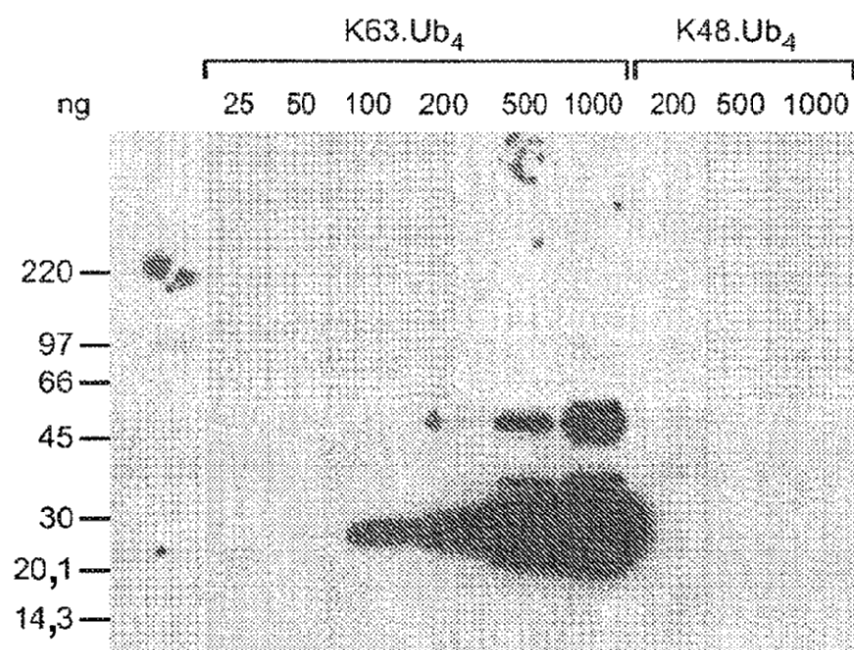


FIG. 24D

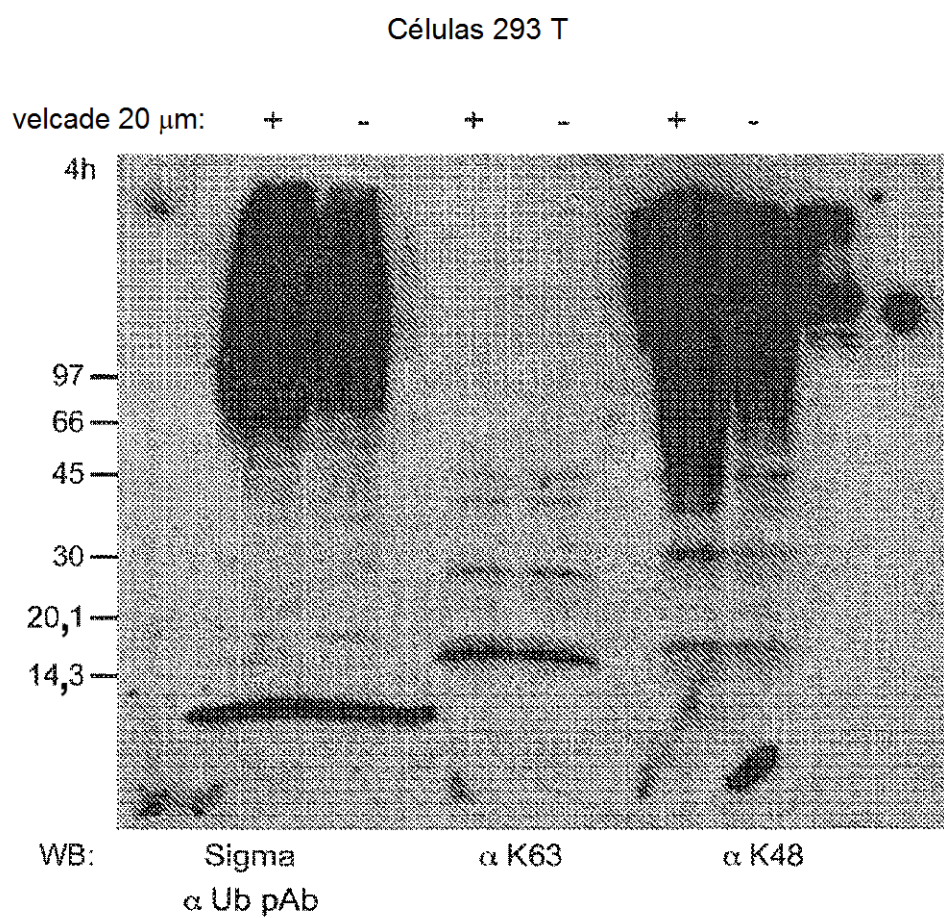


FIG. 25

