

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 439**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2007 PCT/JP2007/054018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07100083**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2007 E 07737666 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2006305**

54 Título: **Anticuerpo modificado con bioactividad mejorada**

30 Prioridad:

03.03.2006 JP 2006057475

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE (50.0%)**

1-6-1, Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi

Kumamoto 860-8568, JP y

TEIJIN PHARMA LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

MASUHO, YASUHIKO y

NAGASHIMA, HIROAKI

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 602 439 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

Anticuerpo modificado con bioactividad mejorada

Campo técnico

5 La presente invención se refiere con métodos para mejorar la actividad efectora de anticuerpos, anticuerpos modificados con actividad efectora fuerte, y métodos para producir los anticuerpos. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para mejorar la actividad de ADCC, que es una actividad efectora principal, anticuerpos modificados que tienen una actividad de ADCC fuerte, y métodos para producir los anticuerpos.

Estado del arte

10 Los anticuerpos se utilizan actualmente comúnmente como agentes terapéuticos (Documento 1 no de patente). Se han convertido en agentes terapéuticos aplicables únicamente debido al desarrollo de diversas técnicas relacionadas con anticuerpos. El método para producir anticuerpos a gran escala se estableció basándose en la técnica de fusión celular desarrollada por G. Kohler y C. Milstein (Documento 2 no de patente). Alternativamente, con el avance de técnicas de recombinación genética, la producción de anticuerpos a gran escala ha sido posible insertando genes de anticuerpo en vectores de expresión e introduciéndolos en células huésped (Documento 3 no de patente).

15 Además, se han mejorado los anticuerpos para que se hagan más cercanos a las moléculas de anticuerpos derivadas de humanos de forma que no tengan inmunogenicidad cuando se administran a seres humanos. Se han desarrollado, por ejemplo, anticuerpos quiméricos que consisten en regiones variables de ratón y regiones constantes humanas (Documento 4 no de patente) y anticuerpos humanizados que consisten en regiones hipervariables de ratón, y regiones marco y constante humanas (Documento 5 no de patente). Con el desarrollo de estas técnicas, los anticuerpos se han puesto en uso práctico como agentes terapéuticos para cánceres, enfermedades autoinmunes, trombosis, inflamación, infección, etc. Están en curso ensayos clínicos para muchos más anticuerpos (Documento 6 no de patente).

20 Aunque las expectativas sobre los productos farmacéuticos de anticuerpo son altas, hay casos en los que, debido a la baja actividad del anticuerpo, no se pueden obtener suficientes efectos terapéuticos sobre cánceres, enfermedades autoinmunes, inflamación, infección y demás, y casos en los que una dosis mayor ha aumentado los costos para el paciente. En estas circunstancias, el aumento de la actividad terapéutica es un objetivo importante para los agentes terapéuticos de anticuerpos.

25 Los efectos de los productos farmacéuticos de anticuerpos incluyen efectos terapéuticos que se ejercen por la unión de sus dos dominios Fab con moléculas de antígeno asociadas a la enfermedad. Por ejemplo, los anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral (TNF) inhiben la actividad del TNF uniéndose al TNF, suprimen la inflamación y ejercen por tanto un efecto terapéutico sobre la artritis reumatoide (Documento 7 no de patente). Ya que producen un efecto terapéutico por unión a moléculas de antígeno e inhiben la actividad de los antígenos, cuanto mayor es la afinidad contra el antígeno, más se espera que los anticuerpos produzcan un efecto más fuerte con una dosis pequeña. El método de selección de clones que tienen alta afinidad con un mismo antígeno de un número de anticuerpos monoclonales se utiliza comúnmente para mejorar la afinidad de unión al antígeno. En un posible método alternativo, se preparan anticuerpos modificados por recombinación genética y se seleccionan aquellos que presentan alta afinidad.

30 Por otra parte, cuando los productos farmacéuticos de anticuerpo apuntan al tratamiento de cánceres, es importante que éstos ejerzan efectos citotóxicos contra sus células cancerosas objetivo. Los anticuerpos unidos a antígenos en la superficie de células objetivo se unen, a través de su dominio Fc, a receptores Fc en la superficie de células efectoras tales como células NK y macrófagos, ejerciendo así daño en células objetivo. Esto se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en lo sucesivo abreviado como ADCC). Alternativamente, los anticuerpos dañan las células mediante la activación de complementos a través del dominio Fc. Esto se llama citotoxicidad dependiente del complemento (abreviado en lo sucesivo como CDC). Además de la actividad citotóxica, los anticuerpos que se unen a microorganismos infectantes también tienen la actividad de unión a receptores Fc en células efectoras y que median fagocitosis o deterioro de los microorganismos infectantes por las células efectoras. Tales actividades de anticuerpos ejercidas a través de los dominios Fc se denominan actividades efectoras.

35 Existen unas pocas especies moleculares diferentes de receptor Fc al que se une la IgG humana. FcγRIA está presente en la superficie celular de macrófagos, monocitos, y demás, y exhibe alta afinidad por IgG humana. FcγRIIA está presente en macrófagos, neutrófilos, y demás, y muestra una afinidad débil para IgG. FcγRIIB está presente en linfocitos B, mastocitos, macrófagos, y demás, exhibe afinidad débil por IgG, y transduce la señal supresora. FcγRIIIA está presente en las células asesinas naturales (NK), macrófagos, y así sucesivamente, tiene afinidad débil por IgG, y desempeña un papel importante en el ejercicio de la actividad de ADCC. FcγRIIIB está

presente en neutrófilos, y tiene el mismo dominio extracelular que FcγRIIIA, pero está unido a la superficie celular a través de un anclaje GPI. Además de estos, existe también FcRn que está presente en el intestino delgado y placenta y está implicado en el metabolismo de IgG. Estos receptores Fc se describen en una revisión (Documento 8 no de patente).

5 Ha habido varios intentos para mejorar la función efectora de anticuerpos con el objetivo de potenciar su actividad terapéutica contra el cáncer. R. L. Shields y colaboradores, han generado múltiples anticuerpos IgG1 humanos modificados en los que los aminoácidos han sido sustituidos en los dominios CH2 y CH3, que constituyen el dominio Fc, y han medido su actividad de unión al receptor Fc y la actividad de ADCC (Documento 9 no de patente). Como resultado, muchos anticuerpos modificados exhibieron actividades de unión menores en comparación con los anticuerpos IgG1 naturales; sin embargo, se observó una actividad ligeramente mejorada de ADCC para algunos de los anticuerpos modificados. Hay un informe sobre un intento de mejorar la actividad de la CDC sustituyendo los aminoácidos en el dominio CH2 al cual se unen los complementos; sin embargo, aunque la unión del complemento C1q se mejoró, la actividad de la CDC fue bastante atenuada (Documento 10 no de patente).

10 Se sabe que una cadena de azúcar está unida a asparagina en la posición 297 en el dominio Fc de anticuerpos IgG1 y que esta diferencia en la cadena de azúcar influye en la actividad efectora de anticuerpos. R. L. Shields y colaboradores han reportado que la ausencia de α1,6-fucosa en la cadena de azúcar de los anticuerpos IgG1 no tiene influencia significativa en la unión a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y al complemento C1q, sino que aumenta la actividad de unión a FcγRIIIA en 50 veces (Documento 11 no de patente). Existen variantes genéticas de FcγRIIIA, que son los tipos en los que el aminoácido en posición 158 es valina (Val) o fenilalanina (Phe). Con ambas variantes, se aumentó la actividad de unión de anticuerpos IgG1 deficientes en α1,6-fucosa a FcγRIIIA. Además, también se informó que los anticuerpos deficientes en α1,6-fucosa exhiben actividad de ADCC mejorada (Documento 11 no de patente). T. Shinkawa y colaboradores también han reportado resultados similares (Documento 12 no de patente).

15 S. G. Telford afirma que los anticuerpos con múltiples regiones Fc tienen una actividad mejorada de Fc (Documento 1 de Patente). Telford preparó anticuerpos modificados que comprenden Fab heterodivalente que consiste en Fab de anti-cadena μ y anti-Fab CD19 y en los que dos regiones Fc están unidas covalentemente en paralelo a través de un enlazador sintético y miden su actividad de ADCC. Sin embargo, cuando se considera que las células objetivo expresan tanto la cadena CD 19 como la cadena μ en su superficie celular, se puede pensar que la mejora de la actividad de ADCC observada por Telford se debe no sólo al efecto de la presencia de múltiples regiones Fc sino también al efecto de la unión eficiente de los anticuerpos modificados a las células objetivo a través del Fab heterodivalente. Debido a que Telford no ha llevado a cabo ninguna evaluación para descartar el efecto de Fab heterodivalente como causa de la actividad de ADCC mejorada, no está claro si el aumento en las regiones Fc es una causa de la actividad mejorada de Fc. Por lo tanto, cuando se generan anticuerpos modificados que tienen múltiples regiones Fc pero que tienen una estructura que difiere de la de los anticuerpos modificados de Telford, si estos anticuerpos modificados tienen una actividad mejorada de Fc o no es totalmente impredecible.

20 Mientras tanto, J. Greenwood generó anticuerpos modificados con porciones de Fc enlazadas en tándem y comparó sus actividades de CDC (Documento 13 no de patente). Contrariamente a lo que se esperaba, todos los anticuerpos modificados tuvieron una actividad de CDC disminuida. Greenwood no ha evaluado la actividad de ADCC de los diversos tipos de anticuerpos modificados.

25 En el Documento 2 de patente, se divulgan anticuerpos que presentan 2 dominios Fc en repetición en Tándem en cada cadena pesada. El método para la producción de dichos anticuerpos incluye la inserción de un fragmento que codifica dominios extra de bisagra CH2 y CH3 en un vector que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo. Sin embargo, se divulga una actividad no efectora tal como citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) que es exhibida por dichos anticuerpos.

30 Como se ha descrito anteriormente, se han producido intentos continuos para mejorar las actividades efectoras de anticuerpos; sin embargo, ninguno de esos intentos ha proporcionado resultados satisfactorios.

[Documento 1 de patente] Patente japonesa No. 2907474, publicación *Kohyo* de la patente japonesa No. (JP-A) H04-504147 (publicación de la fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa), WO90/04413.

[Documento 2 de patente] WO 2005/077981

35 [Documento 1 no de patente] Brekke OH. y colaboradores, *Nature Review Drug Discovery*, 2, 52 (2003).

[Documento 2 no de patente] Kohler G. y colaboradores, *Nature*, 256, 495 (1975) .

[Documento 3 no de patente] Carter P. y colaboradores, *Nucleic Acid Research*, 13, 4431 (1985).

[Documento 4 no de patente] Boulianne GL y colaboradores, Nature, 312, 643 (1984).

[Documento 5 no de patente] Jones PT. y colaboradores, Nature, 321, 522 (1986).

[Documento 6 no de patente] Reichert JM. y colaboradores, Nature Biotechnology, 23, 1073 (2005).

[Documento 7 no de patente] Lipsky PE. y colaboradores, New England Journal of Medicine, 343, 1594 (2000) .

5 [Documento 8 no de patente] Takai T. Nature Review Immunology, 2, 580 (2002).

[Documento 9 no de patente] Shields RL. y colaboradores, Journal of Biological Chemistry, 276, 6591(2001).

[Documento 10 no de patente] Idusogie EE. y colaboradores, Journal of Immunology, 166, 2571 (2001).

[Documento 11 no de patente] Shields RL., y colaboradores, Journal of Biological Chemistry, 277, 26733 (2002).

[Documento 12 no de patente] Shinkawa T., y colaboradores, Journal of Biological Chemistry, 278, 3466, (2003).

10 [Documento 13 no de patente] Greenwood J., y colaboradores, Therapeutic Immunology, 1, 247 (1994).

[Documento 14 no de patente 14] Oettgen HC. y colaboradores, Hybridoma, 2, 17 (1983).

[Documento 15 no de patente] Huhn D. y colaboradores, Blood , 98, 1326 (2001).

[Documento 16 no de patente] Press OW. y colaboradores, Blood , 69, 584, (1987).

Divulgación de la invención

15 [Problemas a resolver por la invención]

La presente invención se logró en vista de las circunstancias descritas anteriormente. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para aumentar las actividades efectoras alterando la estructura de moléculas de anticuerpo, en particular métodos para mejorar la actividad de ADCC. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir anticuerpos modificados con actividad mejorada, y tales anticuerpos modificados.

20

[Medios para resolver los problemas]

Los presentes inventores realizaron estudios dedicados para lograr los objetivos descritos anteriormente. A pesar de los hallazgos anteriores, los presentes inventores generaron anticuerpos modificados con porciones de Fc ligadas en tándem y evaluaron la actividad efectora de los anticuerpos modificados. Sorprendentemente, se confirmó que los anticuerpos modificados con porciones de Fc unidas en tándem tenían una actividad de ADCC significativamente mejorada en comparación con anticuerpos naturales. De acuerdo con los hallazgos anteriores, no se pudo descartar la posibilidad de que la actividad de ADCC mejorada de anticuerpos modificados con Fc unida paralelamente sea un efecto del Fab heterodivalente. Además, considerando que los anticuerpos modificados ligados en tándem tenían una actividad de CDC disminuida, el efecto de los anticuerpos modificados de la presente invención fue inesperado. Además, los anticuerpos modificados que tienen tres regiones Fc exhibieron actividad de ADCC adicionalmente mejorada que los anticuerpos modificados con dos regiones Fc. Se deduce que la actividad de ADCC mejorada de los anticuerpos modificados de la presente invención está correlacionada con el número de regiones Fc unidas en tándem. Los presentes inventores demostraron que la actividad efectora de anticuerpos podría mejorarse mediante la unión en tándem de los dominios Fc a anticuerpos, y de este modo completaron la presente invención.

25

30

35

Por lo tanto, la presente invención se refiere a métodos para aumentar la actividad efectora de anticuerpos mediante la unión de dominios Fc en tándem. Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un método para mejorar una actividad efectora de un anticuerpo, en el que una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de la IgG1 humana están unidos en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo por una técnica de ingeniería genética, en donde la actividad efectora es actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está unida en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/ serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana;

40

45

- [2] un método para producir un anticuerpo modificado con actividad efectora mejorada, en el que una o más estructuras
- 5 que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están unidas en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo por una técnica de ingeniería genética, en donde la actividad efectora es actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está unida en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos, en la que la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana;
- 10 [3] un método para producir un anticuerpo modificado con actividad efectora mejorada, en donde la actividad efectora es
- actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), que comprende las etapas de: (a) expresar una actividad polinucleótido que codifica una cadena ligera y un polinucleótido que codifica una cadena pesada alterada en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están unidas en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está unida en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible glicina/ serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana; y (b) recoger los productos de expresión del polinucleótido;
- 15 [4] el método de cualquiera de [1] a [3], en donde las estructuras comprenden un polipéptido espaciador en el lado N-terminal del dominio Fc de la IgG1 humana;
- 20 [5] el método de cualquiera de [1] a [4], donde el número de estructuras es dos;
- [6] el método de [4] o [5], en donde el polipéptido espaciador de acuerdo con [4] se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 48, 49 y 50;
- 25 [7] un anticuerpo modificado, en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están enlazadas en tándem al terminal C de una cadena pesada de anticuerpo, siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está unida en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana;
- 30 [8] el anticuerpo modificado de [7], en donde las estructuras comprenden un polipéptido espaciador en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana;
- [9] el anticuerpo modificado de [7] u [8], en donde el número de estructuras es dos;
- 35 [10] El anticuerpo modificado de cualquiera de [8] o [9], en donde el polipéptido espaciador de acuerdo con [8] se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 48, 49 y 50;
- [11] el anticuerpo modificado de cualquiera de [7] a [10] para uso en medicina;
- [12] el anticuerpo modificado de cualquiera de [7] a [10] para uso en un método para tratar el cáncer;
- 40 [13] el método de cualquiera de [1] a [6] o el anticuerpo modificado de cualquiera de [7] a [10], en donde dicho espaciador de 15 residuos de aminoácidos es GGGSGGGSGGGGS;
- [14] el método de cualquiera de [1] a [6], en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el antígeno CD20 de diferenciación específica de células B;
- [15] el anticuerpo modificado de cualquiera de [7] a [10], que es un anticuerpo contra el antígeno CD20 de diferenciación específica de células B.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1-1 muestra el procedimiento para construir el vector de expresión pCAGGS1-neoN-L/cadena L Anti-CD20 descrito en el Ejemplo 1.
- La Fig. 1-2 es una continuación de la Fig. 1-1.
- 5 La Fig. 2-1 muestra el procedimiento para construir el vector de expresión pCAGGS1-dhfrN-L/cadena H anti-CD20 descrito en el ejemplo 2.
- La Fig. 2-2 es una continuación de la Fig. 2-1.
- La Fig. 3 muestra la estructura génica de la cadena H final descrita en el Ejemplo 2 y los correspondientes cebadores (SEQ ID NOs: 34 a 45). En (1) a (12) de esta figura, los subrayados sencillos indican sitios de la enzima de restricción y los subrayados dobles indican secuencias espaciadoras.
- 10 La Fig. 4 es un diagrama esquemático de los anticuerpos generados en el Ejemplo 3.
- La Fig. 5 muestra cromatogramas de filtración en gel después de purificación por afinidad con Proteína A, descritos en el Ejemplo 4. Estos son cromatogramas obtenidos por filtración en gel de los productos M, RTX (Rituximab), D0, D1, D2, D3, T0, T1, T2 y T3.
- 15 La Fig. 6 muestra un resultado del análisis PAGE de anticuerpos después de la filtración en gel descrita en el Ejemplo 5. El resultado se obtuvo llevando a cabo una SDS-PAGE en condiciones reductoras y transferencia tipo Western con anticuerpo anti-IgG humano (H+L) de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante o anticuerpo de anti-cadena κ humana de cabra.
- La Fig. 7 muestra los resultados del análisis por HPLC de anticuerpos después de la filtración en gel descrito en el Ejemplo 5. Se muestran los HPLC (filtraciones en gel) de M, RTX, D0, D1, D2, D3, T0, T1, T2 y T3 purificados.
- 20 La Fig. 8 muestra los resultados del ensayo de unión a CD20 de anticuerpos mediante citometría de flujo descrita en el Ejemplo 6. (1): M, Trastuzumab como control negativo y RTX como control positivo. (2): D0, D1, D2 y D3. (3): T0, T1, T2 y T3.
- La Fig. 9-1 muestra un resultado del ensayo de unión al receptor mediante ELISA utilizando el Fc γ RIA recombinante descrito en el Ejemplo 7.
- 25 La Fig. 9-2 muestra un resultado del ensayo de unión al receptor mediante ELISA usando Fc γ RIIA recombinante descrito en el Ejemplo 7.
- La Fig. 9-3 muestra un resultado del ensayo de unión al receptor mediante ELISA usando Fc γ RIB recombinante descrito en el Ejemplo 7.
- 30 La Fig. 9-4 muestra un resultado del ensayo de unión al receptor mediante ELISA usando Fc γ RIIA recombinante (tipo Val¹⁵⁸) descrito en el Ejemplo 7.
- La Fig. 9 - 5 muestra un resultado del ensayo de unión al receptor mediante ELISA usando Fc γ RIIA recombinante (tipo Phe¹⁵⁸) descrito en el Ejemplo 7.
- La Fig. 10 muestra un resultado del ensayo de actividad de ADCC descrito en el Ejemplo 8.
- La Fig. 11 muestra un resultado del ensayo de actividad de CDC descrito en el Ejemplo 9.
- 35 Mejor forma para llevar a cabo la invención
- 40 Como un nuevo método para aumentar la actividad efectora de anticuerpos, la presente invención proporciona un "método para aumentar la actividad efectora de anticuerpos, que comprende enlazar en tándem una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo". El método de la presente invención permite obtener anticuerpos modificados con actividad efectora mejorada en donde la actividad efectora es actividad de ADCC comparada con los anticuerpos originales (en adelante también denominada "anticuerpos modificados de la presente invención"), mientras que la afinidad de los anticuerpos originales contra los antígenos se mantiene.

El origen de los anticuerpos de la presente invención no está particularmente limitado. Los anticuerpos pueden derivarse, por ejemplo, de cualquiera de: primates tales como humanos, monos y chimpancés; roedores tales como ratón, rata y cobaya; mamíferos tales como conejo, caballo, oveja, burro, ganado, cabra, perro y gato; o pollo. Sin embargo, se derivan preferiblemente de humanos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos anticuerpo o anticuerpos en los que se han introducido algunas mutaciones artificiales. Además, también pueden denominarse anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser inmunoglobulinas pertenecientes a cualquier clase o cualquier subclase. Sin embargo, son preferiblemente de la clase IgG, y más preferiblemente de la subclase IgG1.

La "estructura que comprende un dominio Fc" de la presente invención (en lo sucesivo también denominada como la "estructura de la presente invención") puede ser el propio dominio Fc de un anticuerpo, o un oligopéptido apropiado puede estar unido como un espaciador en el extremo terminal N del dominio Fc.

En general, el dominio Fc de un anticuerpo es un fragmento que se obtiene después de digerir una molécula de inmunoglobulina con papaína. Un dominio Fc está constituido, a partir del extremo terminal N de la región constante de la cadena pesada, por la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces S-S en la región bisagra. Los anticuerpos pueden doblarse en la región bisagra. Las dos cadenas pesadas de IgG1 están unidas entre sí a través de enlaces no covalentes en los dominios CH3 y enlaces disulfuro en las regiones bisagra. Los dominios Fc tienen cadenas de azúcar; sin embargo, las cadenas de azúcar pueden contener mutaciones siempre y cuando los dominios Fc tengan la capacidad de aumentar la actividad efectora cuando están unidos al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos pueden carecer de α 1,6-fucosa en las cadenas de azúcar.

El origen de los dominios Fc en la estructura de la presente invención puede ser el mismo o diferente del anticuerpo al que se va a unir la estructura de la presente invención. Sin embargo, desde el punto de vista de la inmunogenicidad, el origen es preferiblemente el mismo que el del anticuerpo al que se va a unir la estructura de la presente invención, cuando el anticuerpo se usa como un producto farmacéutico de anticuerpo. Por ejemplo, cuando un anticuerpo al que está unida la estructura de la presente invención es un anticuerpo derivado de un ser humano o un anticuerpo humanizado, el dominio Fc en la estructura de la presente invención es preferiblemente un dominio Fc humano. Muchas secuencias de cadena pesada de anticuerpo (cadena H) se han registrado en bases de datos públicas como genes para cadenas H de IgG1 que incluyen regiones V. Los ejemplos incluyen el número de acceso BC019337 del GenBank (una secuencia de ADN de región constante humana). La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de IgG1 (región V derivada de CD20 de la secuencia guía (secuencia de aminoácidos con acceso No. AAL27650)-CH1-bisagra-CH2-CH3) usada en los Ejemplos se muestra en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de nucleótidos que codifica al dominio Fc humano corresponde a la posición 721 a 1413 en la SEQ ID NO: 3. Los ADNc del dominio Fc pueden prepararse por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los ADNc de dominio Fc se pueden preparar, por ejemplo, mediante métodos conocidos de amplificación de ácidos nucleicos usando cebadores diseñados con base en la secuencia desde la posición 721 a 1413 en la SEQ ID NO: 3 y, como plantilla, los ARNm preparados a partir de células que expresan anticuerpos. Alternativamente, pueden prepararse mediante el uso como sonda de una porción de la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y seleccionar las secuencias que hibridan con la sonda a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de células que expresan anticuerpos.

Además, los dominios Fc en la estructura de la presente invención pueden comprender mutaciones espontáneas o artificiales siempre que tengan actividad de unión al receptor Fc. Por ejemplo, polipéptidos codificados por secuencias que hibridan bajo condiciones rigurosas con la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos desde la posición 721 a 1413 en la SEQ ID NO: 3, y polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos con sustitución, supresión, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia desde la posición 241 a la 471 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 también se incluyen en el dominio Fc de las estructuras de la presente invención, siempre y cuando tengan actividad de unión al receptor Fc. Tales variantes del dominio Fc también pueden prepararse por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente las condiciones de hibridación rigurosas anteriores. Por ejemplo, se lleva a cabo una hibridación previa en una solución de hibridación que contiene formamida al 25%, o formamida al 50% bajo condiciones más rigurosas, y 4x SSC, Hepes 50 mM (pH 7,0), solución de Denhardt 10x y 20 μ g/mL de ADN desnaturalizado de esperma de salmón a 42°C durante la noche. Las sondas marcadas se añaden luego y la hibridación se lleva a cabo por incubación a 42°C durante la noche. Se llevan a cabo lavados posteriores a la hibridación con diferentes niveles de rigurosidad, incluyendo condiciones de rigurosidad moderada "1x SSC, SDS al 0,1%, 37°C", rigurosidad alta "0,5x SSC, SDS al 0,1%, 42°C" y la rigurosidad más alta "0,2x SSC, SDS al 0,1%, 65°C". A medida que aumenta la rigurosidad de los lavados posteriores a la hibridación, se espera aislar polinucleótidos con mayor homología con la secuencia de la sonda. Las combinaciones anteriormente descritas de SSC, SDS y condiciones de temperatura son simples ejemplos. Los expertos en la técnica pueden alcanzar las mismas restricciones que aquellas descritas anteriormente mediante la combinación apropiada de los factores anteriores o de otros (tal como concentración de la sonda, longitud de la sonda o período de hibridación) que afectan la rigurosidad de la hibridación.

Los polipéptidos codificados por polinucleótidos aislados usando tales técnicas de hibridación usualmente comprenderán secuencias de aminoácidos con alta homología con los dominios Fc descritos anteriormente. "Alta homología" se refiere a homología de secuencia de al menos 40% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, más preferiblemente al menos 95% o más y más preferiblemente al menos 97% o más (por ejemplo, 98% a 99%). La identidad de secuencia de aminoácidos puede determinarse, por ejemplo, utilizando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul (Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1990) 87, 2264-2268, Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1993) 90, 5873 - 5877). Se ha desarrollado un programa denominado BLASTX basado en este algoritmo (Altschul y colaboradores, J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-410). Cuando se utiliza BLASTX para analizar secuencias de aminoácidos, los parámetros son, por ejemplo, una puntuación de 50 y una longitud de palabra de 3. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto para cada programa. La metodología específica para estos métodos de análisis es bien conocida (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Además, las técnicas para preparar artificialmente variantes del dominio Fc mediante introducción artificial de mutaciones en los dominios Fc también son conocidas por los expertos en la técnica. Tales variantes del dominio Fc pueden ser preparadas artificialmente, por ejemplo, mediante la introducción de mutaciones específicas del sitio o aleatorias en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 por métodos de modificación genética, tales como mutagénesis basada en PCR o mutagénesis de casete. Alternativamente, las secuencias con mutaciones introducidas en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3 pueden ser sintetizadas usando sintetizadores de ácidos nucleicos comercialmente disponibles.

Las estructuras comprendidas por el anticuerpo modificado de la presente invención pueden no tener ningún oligopéptido espaciador. Sin embargo, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está unida en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos en donde la unidad básica consiste de cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana. Además las estructuras contienen preferiblemente oligopéptidos espaciadores. Las combinaciones de glicina y serina se usan a menudo como el espaciador (Journal of Immunology, 162, 6589 (1999)). Como se describe en los Ejemplos, un espaciador que tiene una combinación de cuatro glicinas y una serina (SEQ ID NO: 48), o un espaciador en el que la secuencia anterior está unida dos veces (SEQ ID NO: 49) o tres veces (SEQ ID NO: 50) puede ser usado como el espaciador de la presente invención. Sin embargo, el espaciador no está limitado a estas secuencias. El espaciador puede tener cualquier estructura siempre y cuando permita el doblado de la región bisagra donde se une el espaciador. Preferiblemente, un espaciador es una secuencia peptídica que no es fácilmente escindida por proteasas o peptidasas. Con respecto a tales secuencias, se puede obtener una secuencia peptídica deseada, por ejemplo, introduciendo diversas condiciones tales como longitud de secuencia en LINKER (Xue F, Gu Z, y Feng JA, LINKER: un servidor web para generar secuencias peptídicas con conformación extendida, Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1; 32 (publicada en el servidor web): W562-5), un programa que ayuda a diseñar secuencias de enlaces. Se puede acceder a LINKER en <http://astro.temple.edu/~feng/Servers/BioinformaticServers.htm>.

Cuando se enlazan entre sí múltiples secuencias de nucleótidos mediante técnicas de ingeniería genética, uno o varios residuos en la secuencia de aminoácidos en la unión a menudo son sustituidos, suprimidos, añadidos y/o insertados, por ejemplo, debido a las secuencias de los sitios de las enzimas de restricción. Dichas mutaciones son conocidas por aquellos expertos en la técnica. Tales mutaciones también pueden ocurrir cuando las estructuras de la presente invención son construidas o cuando se enlazan a anticuerpos. Tales mutaciones pueden ocurrir, por ejemplo, en las uniones entre las regiones V y C, y las uniones entre el extremo terminal C de Fc y el extremo terminal N de las estructuras de la presente invención (el extremo terminal N de Fc o espaciador). Incluso con tales mutaciones, se incluyen en las estructuras o anticuerpos modificados de la presente invención siempre y cuando tengan una actividad de unión al receptor Fc.

Las estructuras comprendidas por el anticuerpo modificado de la presente invención pueden mejorar la actividad efectora de un anticuerpo cuando se enlazan al extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo, en donde la actividad efectora es actividad de ADCC. Un número arbitrario de estructuras de la presente invención, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco estructuras, pueden ser enlazadas, sin embargo, se enlazan preferiblemente una o dos estructuras. Por lo tanto, los anticuerpos modificados sobre los cuales se han unido las estructuras de la presente invención pueden comprender dos o más dominios Fc arbitrarios, y el número de dominios Fc en un anticuerpo modificado es dos o tres. En los ejemplos, se confirmó que los anticuerpos modificados en los cuales se han unido dos estructuras de la presente invención muestran una actividad de ADCC más fuerte que los anticuerpos modificados en los que se ha unido una estructura de la presente invención.

No existe limitación en el tipo de antígeno que es reconocido por el anticuerpo al cual se unen las estructuras de la presente invención. El antígeno puede ser cualquier antígeno, específicamente, la región variable de un anticuerpo modificado de la presente invención puede reconocer cualquier antígeno. Las regiones variables de cadena H y de cadena L de los anticuerpos modificados usados en los Ejemplos descritos a continuación son las regiones variables de 1F5, que es un anticuerpo monoclonal de ratón contra CD20, un antígeno de diferenciación de linfocitos B

humanos (Documento 14 no de patente). CD20 es una proteína de 297 aminoácidos, y su peso molecular es de 33 a 37 kDa. CD20 está altamente expresada en linfocitos B. Rituximab, un anticuerpo quimérico contra CD20, es ampliamente utilizado como un agente terapéutico efectivo para linfoma no Hodgkin (Documento 15 no de patente). Los anticuerpos anti-CD20 conocidos incluyen anticuerpos monoclonales de ratón B1 y 2H7, además de Rituximab y 1F5 (Documento 16 no de patente). Sin embargo, las regiones variables de los anticuerpos modificados de la presente invención no se limitan a las regiones variables de 1F5. Los dominios Fc están físicamente distantes de los dominios Fab; por lo tanto, se piensa que el tipo de dominio Fab no tiene casi influencia sobre la actividad del dominio Fc. Por lo tanto, las regiones variables de cualquier anticuerpo diferentes a 1F5 pueden ser utilizadas como las regiones variables de los anticuerpos modificados de la presente invención, y las regiones variables de los anticuerpos dirigidos a cualquier antígeno diferente de CD20 pueden ser utilizadas como las regiones variables de los anticuerpos modificados de la presente invención.

Independientemente de la actividad de unión al antígeno, los métodos de la presente invención pueden aumentar el efecto terapéutico de un anticuerpo mejorando la actividad efectora exhibida por el dominio Fc del anticuerpo. La mejora de la actividad de unión a los receptores Fc es requerida para aumentar la actividad efectora, en donde la actividad efectora es actividad de ADCC, de un anticuerpo. En general, la intensidad de la unión entre dos moléculas se considera que es como sigue. La intensidad de unión entre una molécula de anticuerpo y una molécula del receptor Fc está representada por: afinidad x valencia de unión = avidéz. Los anticuerpos IgG naturales tienen un Fc; por lo tanto, la valencia de unión es 1 incluso cuando existen muchos receptores Fc en la superficie de las células efectoras. Sin embargo, cuando los anticuerpos y antígenos forman complejos, los complejos inmunes se unen a las células efectoras de una forma multivalente. La valencia de unión varía dependiendo de la estructura de los complejos inmunes. Las células cancerosas tienen muchos antígenos en la superficie de la célula; por lo tanto, los anticuerpos se unen a estos antígenos y se unen a los receptores Fc sobre las células efectoras de una forma multivalente. Sin embargo, la densidad de antígenos en células cancerosas es a menudo baja; por lo tanto, los anticuerpos unidos a los antígenos se unen con menor valencia a los receptores Fc. Por esta razón, la actividad de ADCC no puede ser suficientemente ejercida y el efecto terapéutico es también insuficiente (Golay, J. y colaboradores, Blood, 95, 3900, (2000)). Sin embargo, mediante la unión en tándem de múltiples dominios Fc a una molécula de anticuerpo, es posible la unión a receptores Fc de una forma multivalente. Esto mejora la actividad de unión entre un anticuerpo y receptores Fc, es decir, la avidéz. Además, se aumenta la actividad efectora.

La presente invención también proporciona métodos para producir anticuerpos modificados con actividad efectora mejorada. Los métodos de la presente invención no solamente mejoran la actividad efectora de anticuerpos obtenidos en forma natural y los anticuerpos quiméricos existentes, sino que también permiten la producción de nuevos anticuerpos quiméricos alterados a partir de una combinación novedosa de regiones variable y constante del anticuerpo de orígenes diferentes. Además, los anticuerpos modificados también pueden comprender una región constante novedosa a partir de la combinación del dominio CH1 y dos o más variantes del dominio Fc descritas anteriormente. La secuencia de nucleótidos del dominio CH1 humano se muestra en las posiciones 430 a 720 en la secuencia de nucleótidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3.

Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo utilizando una combinación apropiada de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, el enlazamiento de las estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana con el extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo se realiza mediante una técnica de ingeniería genética. Un ejemplo de expresión de los anticuerpos modificados de la presente invención se describe a continuación, en el que los ADN para las regiones variable y constante de cadena pesada (cadena H) y cadena ligera (cadena L) se preparan y enlazan usando técnicas de ingeniería genética.

Las secuencias de la región variable pueden prepararse, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, se genera una biblioteca de ADNc a partir de hibridomas que expresan el anticuerpo de interés o células introducidas con el gen del anticuerpo, y se clona ADN para la región variable de interés. Una secuencia guía del anticuerpo L se enlaza secuencia arriba de la región variable de cadena H, VH, y la variable de cadena L, VL, para construir las estructuras de ADN [LVH] y [LVL].

Para la región constante del anticuerpo, primero, se genera una biblioteca de ADNc a partir de células de mieloma humano o tejidos linfáticos humanos tales como de amígdala. Se obtienen fragmentos de ADNc para la región constante de cadena H [CH1-Fc] y para la región constante de cadena L [CL] por amplificación mediante métodos conocidos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores diseñados con base en las secuencias parciales de los extremos 5' y 3' de las regiones constantes de cadena H y de cadena L. Los fragmentos se insertan luego en vectores y se clonan.

Para la cadena L, se construye la estructura de ADN [LVL-CL] en la cual se enlazan LVL y CL. Como ejemplo, se muestra la secuencia de ADN de la estructura de ADN [LVL-CL] (secuencia guía, región V de 1F5 y región C de cadena Lk humana) preparada en los Ejemplos en la SEQ ID NO: 1, mientras que la secuencia de aminoácidos codificada por la estructura de ADN se muestra en la SEQ ID NO:2. La cadena H enlazada con una estructura de la presente invención (cadena H alterada) y la cadena H sin una estructura enlazada de la presente invención se construyen mediante el procedimiento descrito a continuación. (i) Se puede construir la estructura de ADN de

cadena H que tiene una sola Fc (cadena H enlazada sin una estructura de la presente invención) enlazando la estructura de ADN [LVH] y la estructura del ADN [codón de terminación del dominio Fc de CH1]. La secuencia de ADN de la estructura de ADN para la cadena H con una sola Fc preparada en los Ejemplos se muestra en la SEQ ID NO: 3, mientras que la secuencia de aminoácidos codificada por la estructura de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 4. (ii) La estructura de ADN de cadena H que tiene dos Fc enlazadas en tándem (cadena H enlazada con una estructura de la presente invención) puede construirse enlazando entre sí la estructura de ADN [LVH], la estructura de ADN [CH1-Fc (sin codón de terminación)], y la estructura de ADN [espaciador-Fc-codón de terminación]. Las secuencias de ADN de las estructuras de ADN para la cadena H que tiene dos Fc enlazadas en tándem preparadas en los Ejemplos se muestran en las SEQ ID NOs: 5 (sin espaciador), 7 (con un sólo espaciador: GGGGS (representada como G4S; SEQ ID NO: 48)), 9 (con dos G4S como espaciador) y 11 (con tres G4S como espaciador). Las secuencias de aminoácidos codificadas por estas estructuras de ADN se muestran en las SEQ ID NOs: 6 (sin espaciador), 8 (con un G4S como espaciador), 10 (con dos G4S como espaciador) y 12 (con tres G4S como espaciador). (iii) La estructura de ADN de cadena H que tiene tres Fc enlazadas en tándem (cadena H enlazada con dos estructuras de la presente invención), puede ser construida por enlazamiento de la estructura de ADN [LVH], estructura de ADN [CH1-Fc (sin codón de terminación)], la estructura de ADN [espaciador-Fc-(sin codón de terminación)], y la estructura de ADN [espaciador-Fc-codón de terminación]. Las secuencias de ADN de las estructuras de ADN para la cadena H que tiene tres Fc enlazadas en tándem preparadas en los Ejemplos se muestran en las SEQ ID NOs: 13 (sin espaciador), 15 (con un G4S como espaciador), 17 (con dos G4S como espaciador), y 19 (con tres G4S como espaciador). Las secuencias de aminoácidos codificadas por estas estructuras de ADN se muestran en las SEQ ID NOs: 14 (sin espaciador), 16 (con un G4S como espaciador), 18 (con dos G4S como espaciador), y 20 (con tres G4S como espaciador). (iv) Los constructos de ADN de cadena H que tienen cuatro o más Fc enlazados en tándem pueden prepararse de forma similar como en el caso con tres Fc, aumentando el número de la estructura de ADN [espaciador-Fc-(sin codón de terminación)].

La estructura de ADN de cadena L y la estructura de ADN de alterada de cadena H preparadas como se describió anteriormente se clonan y luego, junto con las regiones reguladoras tales como el promotor y el reforzador, se insertan en vectores de expresión. Alternativamente, se pueden insertar en vectores de expresión que ya tienen regiones reguladoras. Los vectores de expresión que pueden usarse incluyen vectores que tienen el promotor CAG (Gene, 108, 193 (1991)) y el vector pcADN (Immunology and Cell Biology, 75, 515 (1997)). Cualesquiera de los vectores de expresión pueden ser usados siempre y cuando sean compatibles con las células huésped que se vayan a utilizar.

Las células huésped pueden seleccionarse apropiadamente de aquellas que pueden expresar glicoproteínas. Tales células huésped pueden seleccionarse, por ejemplo, a partir de células animales, células de insecto, levaduras, y similares. Ejemplos específicos incluyen células CH-DG44 (Cytotechnology, 9, 237 (1992)), células COS-1, células COS-7, células NS0 de mieloma de ratón y células YB2/0 de mieloma de rata que pueden producir moléculas de anticuerpo que tienen cadenas de azúcar que carecen de fucosa, pero las células no están limitadas a las mismas.

Las células huésped recombinantes se cultivan y los anticuerpos modificados se purifican a partir de los sobrenadantes del cultivo. Se pueden usar diversos tipos de medios de cultivo para cultivo; sin embargo, los medios libres de suero son convenientes para purificar anticuerpos. Los anticuerpos modificados de interés se purifican a partir de los sobrenadantes de cultivo eliminando fragmentos y agregados de los anticuerpos modificados, y proteínas distintas de los anticuerpos modificados con métodos de purificación conocidos, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad con proteína A inmovilizada que tiene actividad de unión selectiva a anticuerpos o similares, y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Si los anticuerpos modificados obtenidos como se ha descrito anteriormente tienen una actividad efectora mejorada, se pueden evaluar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. La actividad de unión a diversos receptores Fc se puede determinar, por ejemplo, mediante técnicas de anticuerpo enzimático utilizando los dominios extracelulares de receptores Fc recombinantes. A continuación se describe un ejemplo específico. En primer lugar, se producen los dominios extracelulares de FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIB y FcγRIIA como receptores para IgG humana. Las secuencias de estos receptores son conocidas y están disponibles en GenBank bajo los siguientes Números de Acceso: FcγRIIA humano: NM_000566, FcγRIIA humano: NM_021642, FcγRIIB humano: NM_001002273, FcγRIIA humano: NM_000569. Estos receptores se inmovilizan en placas de 96 pozos para técnicas de anticuerpos enzimáticos. Los anticuerpos modificados con concentraciones variables se hacen reaccionar, y los anticuerpos anti-IgG humanos marcados o similares se hacen reaccionar como un anticuerpo secundario. Las cantidades de anticuerpos modificados unidos a los receptores se miden con base en la señal de la etiqueta. Se conocen variantes genéticas de FcγRIIA (Journal of Clinical Investigation, 100, 1059 (1997)), y los receptores en los que el aminoácido en posición 158 es valina o fenilalanina se usan en los Ejemplos de la presente invención.

La actividad de ADCC de anticuerpos modificados se puede medir utilizando células efectoras y objetivo. Por ejemplo, se pueden usar monocitos separados de sangre periférica de individuos sanos como células efectoras. Las células que expresan el antígeno CD20, tales como células Ramos y células Raji, se pueden utilizar como células

objetivo. Después de que las células objetivo se hacen reaccionar con anticuerpos modificados diluidos en forma serial, se añaden las células efectoras. La proporción del número de células efectoras respecto al número de células objetivo puede estar en un intervalo de 10:1 a 100:1 y la proporción es preferiblemente de 25:1. Cuando las células objetivo están dañadas por la actividad de ADCC de los anticuerpos modificados, la lactato deshidrogenasa (LDH) en las células se libera en el sobrenadante del cultivo. Por lo tanto, la actividad de ADCC se puede determinar recogiendo la LDH liberada y midiendo su actividad enzimática. Ya que el anticuerpo modificado de la presente invención mejora la actividad de ADCC, se usa este ensayo cuando se evalúa si el anticuerpo modificado tiene actividad efectora modificada.

En cuanto a la actividad de CDC, se puede evaluar la actividad citotóxica, por ejemplo, haciendo reaccionar las células objetivo con anticuerpos modificados diluidos en forma serial y luego añadiendo suero fresco de conejo bebe como fuente de complementos, como se describe en los Ejemplos. Dado que se utiliza suero que contiene LDH, la actividad citotóxica se evalúa midiendo el número de células viables usando Alamar Blue o métodos similares.

Los anticuerpos modificados obtenidos por los métodos de la presente invención no sólo mejoran la actividad efectora *in vitro* descrita anteriormente sino que también ejercen el efecto reforzador de la inmunidad celular *in vivo* con base en una actividad efectora mejorada. Por lo tanto, se piensa que los anticuerpos contribuyen al tratamiento de enfermedades que se puede esperar que sean mejoradas por inmunidad celular. Los anticuerpos modificados de la presente invención pueden administrarse en una forma de dosificación apropiada mediante una vía de administración apropiada, dependiendo del tipo de enfermedad, edad del paciente, síntomas y otros. Además, los anticuerpos modificados de la presente invención pueden formularse mediante métodos de formulación conocidos y suministrarse como productos farmacéuticos junto con instrucciones que indican la eficacia y los efectos, las precauciones para el uso, y así sucesivamente. Cuando se formulan, se pueden añadir apropiadamente aditivos adecuados, tales como excipientes, estabilizadores, conservantes, tampones, agentes de suspensión, emulsionantes y agentes solubilizantes farmacéuticamente aceptables dependiendo del propósito, para asegurar sus propiedades y calidad. Por ejemplo, los anticuerpos pueden combinarse con Polisorbato 80, cloruro sódico, citrato sódico, ácido cítrico anhidro, o como cuando se formulan como inyecciones, preparados con solución salina fisiológica o solución de glucosa para inyección en el momento del uso, y se administran por infusión intravenosa de goteo o un método similar. La dosis se puede ajustar dependiendo de la edad y el peso del paciente, y factores similares. Una dosis única en dicha infusión intravenosa por goteo es, por ejemplo, de 10 a 10000 mg/m², preferiblemente de 50 a 5000 mg/m², y más preferiblemente de 100 a 1000 mg/m², pero se limita a estos valores.

Todas las referencias de la técnica anterior citadas aquí se incorporan por referencia en esta descripción.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe específicamente en el contexto de los Ejemplos; sin embargo, no se debe interpretar como limitada a los mismos.

[Ejemplo 1] Construcción del vector de expresión pCAGGS1-neoN-L/anti-CD20 LC (cadena ligera) 1-1. Preparación del vector pEGFP-N1/VL (Fig. 1-1- A)

El gen de la región VL de IgG2a anti-CD20 de ratón se clonó mediante el siguiente procedimiento. El hibridoma de ratón 1F5 se cultivó usando RPMI-1640 que contiene suero fetal bovino inactivado al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg mL estreptomycin (Sigma Aldrich) a 37°C bajo CO₂ al 5%, y luego se extrajo el ARN total de las células utilizando ISOGEN (NIPPON GENE CO.). Se añadieron 10 pmol de cebador oligo dT (5'-CGAGCTCGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') (SEQ ID NO: 21)) a 10 µg del ARN total y se ajustó el volumen total a 12 µL añadiendo agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC). Después de dos minutos de incubación a 72°C para destruir su estructura de orden superior, el ARN se transfirió rápidamente sobre hielo y se incubó durante tres minutos. Se añadió el ARN con 2 µL del regulador de reacción 10x adjunto (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 1 µL de DTT 100 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 1 µL de dNTP 20 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 1 µL de 20 U/µL del inhibidor de RNasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Se ajustó el volumen total a 19 µL con agua tratada con DEPC. Después de calentar hasta 42°C, se añadió 1 µL de 200 U/µL de ReverscriptII (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se incubó la mezcla resultante a 42°C durante 50 minutos sin tratamiento adicional. Después de la reacción, se añadieron 80 µL de TE (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)). La mezcla resultante de 100 µL se usó como solución de ADNc.

Se combinaron sobre hielo 7,8 µL de agua MilliQ estéril, 4 µL del regulador 5x anexo, 2µL de dNTP 2,5 mM, 2 µL de cebador directo 10 µM (5'TCGTCTAGGCTAGCATTGTTCTCTCCCAGTCTCCA-3' (SEQ ID NO: 22) que tiene un sitio *NheI* (subrayado)), 2 µL de cebador inverso 10 mM (5'-GCTTGAGACTCGAGCAGCTTGGTCCCAGCACCGAA-3' (SEQ ID NO: 23) que tiene un sitio *XhoI* (subrayado)), 2 µL de ADNc derivado de 1F5 como plantilla, y 0,2 µL de 5 U/µL del Sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS} (Roche). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La solución de reacción se sometió a electroforesis utilizando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% (Solana) y se recogió una banda de aproximadamente 0,31 kpb utilizando

RECOCHIP (TaKaRa Bio Inc.). El fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. El fragmento de ADN se trató con *NheI* (TOYOBO) y *XhoI* (TaKaRa Bio Inc.) a las concentraciones finales de 0,8 U/μL y 0,5 U/μL, respectivamente, y se ligó con 50 ng de pEGFP-N1 (BD Biosciences) tratados en la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 (Promega) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 μL de células competentes de *E. coli* DH5α, que habían sido preparadas por el procedimiento de cloruro de potasio, a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Estas descansaron durante dos minutos sobre hielo, después de lo cual se añadió 1 mL de medio SOC (Bacto triptona al 2% (BD Biosciences), extracto de levadura Bacto al 0,5% (BD Biosciences), y cloruro de sodio al 1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)). La mezcla resultante se transfirió a un tubo de ensayo y las bacterias se cultivaron con agitación a 37°C durante dos horas. Después de agitar, se sembraron 100 μL de la suspensión bacteriana sobre una placa de medio LB que contenía 100 μg/mL de kanamicina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado el gen de la región VL, y el vector se denominó pEGFP-N1/VL.

1-2. Preparación del vector pEGFP-N1/LVL (Fig. 1-1- B)

Se añadió una secuencia guía al gen de VL mediante el siguiente procedimiento. Se combinaron sobre hielo 4 μL del regulador 5x adjunto, 2 μL de dNTP 2,5 mM, 2 μL de cebador directo 10 mM (5'-GAGTTTGCTAGCGCCGCCATGGA TTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTCTGCTAATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATTGTTCTCTCC CAGTCTCCAGCA-3' (SEQ ID NO: 24) que tiene un sitio *NheI* (subrayado), la secuencia guía corresponde a las posiciones 13 a 57 en la SEQ ID NO: 24, 2 μL de cebador inverso 10 μM (5'-GCTTGAGACTCGAGCAGCTTGGTCCAGCACCGA A-3' (SEQ ID NO: 25) que tiene un sitio *XhoI* (subrayado)), 100 ng de pEGFP-N1/VL como plantilla, que ha sido preparado como se describe en (1), y 0,2 μL de 5 U/μL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 μL añadiendo agua MilliQ estéril. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Se sometió la disolución de reacción a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1%. Se recogió una banda de aproximadamente 0,38 kpb utilizando RECOCHIP. El fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico.

El fragmento de ADN se trató con *NheI* y *XhoI* a concentraciones finales de 0,8 y 0,5 U/μL, respectivamente, y se ligó con 50 ng de pEGFP-N1 tratado de la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 μL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. A continuación se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo, después de lo cual se añadió 1 mL de medio SOC. La mezcla resultante se transfirió a un tubo de ensayo y las bacterias se cultivaron con agitación a 37°C durante dos horas. Después de agitar, se sembraron 100 μL de la suspensión bacteriana sobre una placa de medio LB que contenía 100 μg/mL de kanamicina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN que tiene el gen de la región VL con una secuencia guía añadida y el vector se denominó pEGFP-N1/LVL.

1-3. Preparación del vector pEGFP-N1/CL (Fig. 1-1-C)

El gen de la región C de cadena κ humana se clonó mediante el siguiente procedimiento. El mieloma humano RPMI8226 se cultivó usando RPMI1640 que contenía suero fetal bovino inactivado al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 μg/mL de estreptomina a 37°C bajo CO₂ al 5% y luego se extrajo el ARN total de las células utilizando ISOGEN. Se añadieron 10 pmol de cebador oligo dT a 10 μg del ARN total y el volumen total se ajustó a 12 μL añadiendo agua tratada con DEPC. Después de dos minutos de incubación a 72°C, el ARN se transfirió rápidamente sobre hielo y se incubó durante tres minutos. Se añadió el ARN con 2 μL del regulador de reacción 10x anexo, 1 μL de DTT 100 mM, 1 μL de dNTP 20 mM y 1 μL de 20 U/μL de inhibidor de RNasa y el volumen total se ajustó a 19 μL con agua tratada con DEPC. Después de calentar hasta 42°C, se añadió 1 μL de 200 U/μL de ReverscriptII y la mezcla resultante se incubó a 42°C durante 50 minutos sin tratamiento adicional. Después de la reacción, se añadieron 80 μL de TE. La mezcla resultante de 100 μL se usó como una solución de ADNc. Se combinaron sobre hielo 4 μL del regulador 5x adjunto, 2 μL de dNTP 2,5 mM, 2 μL de cebador directo 10 μM (5'-ACCTCTAACTCGAGACTGTGGCTGCACCATCTGT-3' (SEQ ID NO: 26) que tiene un sitio *XhoI* (subrayado)), 2 μL de cebador inverso 10 μM (5'-ACTTGAATTCCTAACACTCT CCCCTGTTGA-3' (SEQ ID NO: 27) que tiene un sitio *EcoRI* (subrayado)), 2 μL de ADNc derivado de RPMI8226 como plantilla y 0,2 μL de 5 U/μL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 μL añadiendo agua MilliQ estéril. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. La solución de reacción se sometió a electroforesis usando y se recogió una banda de aproximadamente 0,32 kpb utilizando RECOCHIP. El fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Esto se trató entonces con *XhoI* y *EcoRI* (TOYOBO), ambos a una concentración final de 0,5 U/μL, y se ligó con 50 ng de pEGFP-

N1 tratados de la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se añadió 1 mL de medio SOC. La mezcla resultante se transfirió a un tubo de ensayo y las bacterias se cultivaron con agitación a 37°C durante dos horas. Después de agitar, se sembraron 100 µL de la suspensión bacteriana sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de kanamicina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado el gen de la región CL y el vector se denominó pEGFP-N1/CL.

1-4. Preparación del vector pEGFP-N1/Anti-CD20 LC (Fig. 1-1-D)

El gen de cadena L anti-CD20 quimérico de ratón/humano (la secuencia de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2) se construyó mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,7 µg de pEGFP-N1/CL con *Xho*I y *Eco*RI, ambos a una concentración final de 0,5 U/µL. Después de que toda la mezcla de reacción se sometió a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% se recogió el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 0,32 kpb utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarlo con fragmentos del vector. Por separado, se trató el vector pEGFP-N1/LVL con *Xho*I y *Eco*RI en las mismas condiciones. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pEGFP-N1/LVL tratados con las enzimas de restricción y se ligaron con el gen de la región CL humana extirpada. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se combinó con 1 mL de medio SOC. La mezcla resultante se transfirió a un tubo de ensayo y las bacterias se cultivaron con agitación a 37°C durante dos horas. Después de agitar, se sembraron 100 µL de la suspensión bacteriana sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de kanamicina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN para el gen de la región VL añadido con la secuencia guía y el gen de la región CL humana, y el vector se denominó pEGFP-N1/Anti-CD20 LC.

1-5. Preparación del vector pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 LC (Fig. 1-2-E)

El gen de la cadena L anti-CD20 quimérico de ratón/humano se transfirió del vector pEGFP-N1 a pcADN3.1/Zeo mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,5 µg de cadena L de pEGFP-N1/Anti-CD20 con *Nhe*I y *Eco*RI a concentraciones finales de 0,8 U/µL y 0,5 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 0,70 kpb se recogió utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarlo con fragmentos de vector. Por separado, el vector pcADN3.1/Zeo (Invitrogen) se trató con *Nhe*I y *Eco*RI bajo las mismas condiciones. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pcADN3.1/Zeo tratado con las enzimas de restricción y se ligaron con el gen LC anti-CD20 extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina (Sigma Aldrich). La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN para el gen LC anti-CD20, y el vector se denominó pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 LC.

1-6. Preparación de pCAGGS1-neoN-L (Fig. 1-2-F)

Se insertó un espaciador en el vector de expresión pCAGGS1-neoN que contenía el promotor CAG y el gen de resistencia a la neomicina mediante el siguiente procedimiento. pCAGGS1-neoN se trató con *Sa*I a una concentración final de 0,5 U/mL. El fragmento de ADN resultante se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Por separado, se sintetizaron dos cadenas de ADN (ADN sentido: GTCGACGCTAGCAAGG ATCCTTGAATTCCTTAAGG (SEQ ID NO: 28); ADN antisentido: GTCGACCTTAAGGAATTC AAGGATCCTTGCTAGCG (SEQ ID NO: 29)). Estos ADN se mezclaron juntos a una concentración final de 1 µM, y el volumen total se ajustó a 10 µL con agua MilliQ. Después de cinco minutos de calentamiento a 75°C, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente para enfriarla gradualmente. Se mezclaron 1 µL de esta solución y se ligó con 50 ng de pCAGGS1-neoN tratado con *Sa*I. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. Se seleccionó un vector pCAGGS1-neoN con un espaciador insertado de entre las colonias formadas. El vector resultante se denominó pCAGGS1-neoN-L. Como resultado de la inserción del

espaciador, se generaron nuevamente dos sitios *SaI* en pCAGGS1-neoN, y la secuencia de los sitios de la enzima de restricción se convirtió en 5'-*SaI*-*NheI*-*Bam*HI-*Eco*RI-*Afl*III-*SaI*-3'.

1-7. Preparación del vector pCAGGS1-neoN-L/Anti-CD20 LC (Fig. 1-2-G)

5 El gen de la cadena L anti-CD20 quimérico de ratón/humano se transfirió del vector pcADN3.1/Zeo al vector pCAGGS1-neoN-L mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,5 µg de pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 LC con *NheI* y *Afl*III (New England Biolabs) a concentraciones finales de 0,8 U/µL y 1,0 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1%, el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 0,70 kpb se recogió utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarlo con fragmentos del vector. Por separado, pCAGGS1-neoN-L se trató con *NheI* y *Afl*III bajo las mismas condiciones. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pCAGGS1-neoN-L tratado con las enzimas de restricción y se ligó con el gen de la cadena L anti-CD20 extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN para el gen LC anti-CD20, y el vector se denominó pCAGGS1-neoN-L/Anti-CD20 LC.

[Ejemplo 2] Construcción del vector de expresión pCAGGS1-dhfrN-L/anti-CD20 HC (cadena pesada)

20 2-1. Preparación del vector pBluescriptII /VH (Fig. 2-1-A)

25 El gen de la región VH de IgG2a anti-CD20 de ratón se clonó mediante el siguiente procedimiento. Se combinaron sobre hielo 7,8 µL de agua Milli-Q estéril, 4 µL del Regulador 5x adjunto, 2 µL de dNTP 2,5 mM, 2 µL de cebador directo 10 µM (5'-CACGCGTTCGACGCCCGCCATGGCCAGGTGCAACTG-3' (SEQ ID NO: 30) que tiene un sitio *SaI* (subrayado)), 2 µL del cebador inverso 10 µM (5'-GCGGCCAAGCTTAGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGC-3' (SEQ ID NO: 31) con un sitio *Hind*III (subrayado)), 2 µL de ADNc derivado de 1F5 como plantilla y 0,2 µL de 5 U/µL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La mezcla de reacción se sometió a electroforesis utilizando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% y se recogió una banda de aproximadamente 0,36 kpb utilizando RECOCHIP. Este fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. El fragmento de ADN se trató con *SaI* (TOYOBO) y *Hind*III (New England Biolabs) a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 1,0 U/µL, respectivamente. El fragmento se ligó con 50 ng de pBluescriptII tratado de la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo, se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN para el gen de la región VH y el vector se denominó pBluescriptII/VH.

2-2. Preparación del vector pBluescriptII/LVH (Fig. 2-1-B)

40 Se añadió una secuencia guía al gen VH mediante el siguiente procedimiento. Se combinaron sobre hielo 4 µL del regulador 5x adjunto, 2 µL de dNTP 2,5 mM, 2 µL de cebador directo 10 µM (5'-CACGCGTTCGACGCCCGCCATGGGATGGAGCTGTATCATCTTCTTTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAACTGCGGCAGCCTGGG-3' (SEQ ID NO: 32) que tiene un sitio *SaI* (subrayado)), 2 µL de cebador inverso 10 µM (5'-GCGGCCAAGCTTAGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGC-3' (SEQ ID NO: 33) que tiene un sitio *Hind*III (subrayado)), 100 ng de pBluescriptII/VH como plantilla y 0,2 µL de 5 U/µL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 µL añadiendo agua MilliQ estéril. La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 12 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La mezcla de reacción se sometió a electroforesis utilizando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% y se recogió una banda de aproximadamente 0,43 kpb utilizando RECOCHIP. Este fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. El fragmento de ADN se trató con *SaI* y *Hind*III a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 1,0 U/µL, respectivamente, y se ligó con 50 ng de pBluescriptII tratado de la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después de reposar durante dos minutos sobre hielo, se sembró en placa la mezcla completa sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a

37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un ADN que tiene el gen de la región VH con una secuencia guía añadida y el vector se denominó pBluescriptII/LVH.

2-3. Preparación del vector pBluescriptII/CH1-CH2-CH3-T (Fig. 2-1-C)

5 Se clonó el gen para la región C de IgG1 humana, a saber, dominio CH1 al dominio CH3 hasta el codón de terminación (-T), mediante el siguiente procedimiento. El ARN total se extrajo de las células de las amígdalas de un ser humano sano utilizando ISOGEN. Se añadieron 10 pmol de cebador oligo dT a 5 µg del ARN total. El volumen total se ajustó a 12 µL añadiendo agua tratada con DEPC. Después de dos minutos de incubación a 72°C, el ARN se transfirió rápidamente sobre hielo y se incubó durante tres minutos. Se añadieron 2 µL del regulador de reacción 10x adjunto, 1 µL de DTT 100 mM, 1 µL de dNTP 20 mM y 1 µL de inhibidor de RNasa de 20 U/µL y el volumen total se ajustó a 19 µL con agua tratada con DEPC. Después de calentar hasta 42°C, se añadió 1 µL de 200 U/µL de ReverscriptII y la mezcla resultante se incubó a 42°C durante 50 minutos sin tratamiento adicional. Después de la reacción, se añadieron 30 µL de TE. La mezcla resultante de 50 µL se usó como una solución de ADNc. Se combinaron sobre hielo 4 µL del regulador 5x adjunto, 2 µL de dNTP 2,5 mM, 2 µL de cebador directo 10 µM (figura 3-(1)), 2 µL de cebador inverso 10 µM (figura 3-(2)), 2 µL de ADNc derivado de células de amígdalas humanas como plantilla, y 0,2 µL de 5 U/µL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. Después de ajustar el volumen total a 20 µL añadiendo agua MilliQ estéril, la PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La mezcla de reacción se sometió a electroforesis utilizando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% y se recogió una banda de aproximadamente 0,99 kpb utilizando RECOCHIP. Este fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. El fragmento de ADN se trató con *HindIII* y *NotI* (New England Biolabs) a concentraciones finales de 1,0 U/µL y 0,5 U/µL, respectivamente, y se ligó con 50 ng de pBluescriptII tratado de la misma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró en placa la mezcla completa sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado el gen de la región C de la IgG1 humana y el vector se denominó pBluescriptII/CH1-CH2-CH3-T.

30 2-4. Preparación del vector pBluescriptII/CH1-CH2-CH3 (Fig. 2-1-D), vector pBluescriptII/SP-CH2-CH3-T (Fig. 2-1-E y 2-1-F) y vector pBluescriptII/SP-CH2-CH3 (Fig. 2-1-G)

El gen que cubre el dominio CH1 al dominio CH3 sin el codón de terminación, el gen que cubre del dominio CH2 al dominio CH3 que contiene el codón bisagra y de terminación y el gen que cubre del dominio CH2 al dominio CH3 que contiene el codón bisagra pero no de terminación, que se derivaron de la región C de la IgG1 humana, se clonaron mediante el siguiente procedimiento. Se combinaron sobre hielo 4 µL del regulador 5x adjunto, 2 µL de dNTP 2,5 mM, 2 µL cada uno de cebadores directo e inverso 10 µM, 0,1 µg de pBluescriptII/CH1-CH2-CH3-T como plantilla y 0,2 µL de 5 U/µL del sistema PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 µL añadiendo agua MilliQ estéril. Los trece pares de cebadores utilizados fueron: cebadores mostrados en la Fig. 3-(1) y (7) para amplificar CH1-CH2-CH3; aquellos mostrados en la Fig. 3-(3) a (6) y (2), o (8) a (11) y (2), para amplificar SP-CH2-CH3-T; y aquellos mostrados en la Fig. (3) a (6) y (12) para amplificar SP-CH2-CH3. Los espaciadores utilizados en este estudio fueron espaciadores flexibles de glicina/serina de 0, 5, 10 ó 15 residuos de aminoácidos (a.a.), en los que la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total. Sin embargo, el tipo de espaciador no está particularmente limitado. Se pueden usar cualquiera de los espaciadores peptídicos convencionales (SP). Tales SP convencionales incluyen, por ejemplo, A (EAAAK) nA (SEQ ID NO: 63), la secuencia en el paréntesis es una secuencia de repetición y n representa el número de repeticiones; Arai R. y colaboradores, Protein Engineering 14, 529-532 (2001)). La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: tratamiento térmico a 95°C durante diez minutos, seguido de 12 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. Después de someter la mezcla de reacción a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% se recogieron los fragmentos de ADN de aproximadamente 0,99 y 0,74 kpb, que cubren del dominio CH1 al dominio CH3 y del dominio CH2 al dominio CH3 que contiene la secuencia peptídica del espaciador, respectivamente, de las bandas utilizando RECOCHIP. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Los fragmentos de ADN se trataron con las correspondientes enzimas de restricción (concentraciones finales de 1,0 U/µL de *HindIII*, 0,75 U/µL de *BamHI* (TaKaRa Bio Inc.), 0,75 U/µL de *XbaI* (TaKaRa Bio Inc.) y 0,5 U/µL de *NotI*), y se ligaron con 50 ng de pBluescriptII tratados de la misma forma. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado un gen de interés de región C y los vectores se denominaron pBluescriptII/CH1-CH2-CH3, pBluescriptII/SP-CH2-CH3-T y pBluescriptII/SP-CH2-CH3.

2-5. Preparación del vector pBluescriptII/ Anti-CD20 HC Fc monómero (Fig. 2-1-H)

El gen monomérico de cadena H de Fc anti-CD20 quimérico de ratón/humano (la secuencia de ADN se muestra en la SEQ ID NO: 3, y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 4) se construyó mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,5 µg de pBluescriptII/LVH (Fig. 2-1-B) con *SalI* y *HindIII* a concentraciones finales de 0,5 y 1,0 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1%, el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 0,43 kpb se recogió utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarla con fragmentos del vector. Por separado, el vector pBluescriptII/CH1-CH2-CH3-T (Figura 2-1-C) fue tratado con *SalI* y *HindIII* bajo las mismas condiciones. Ambos fragmentos de ADN fueron purificados mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pBluescriptII/CH1-CH2-CH3-T tratado con las enzimas de restricción y se ligó con el gen LVH extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo, se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/ mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas dentro de las cuales se ha insertado un ADN para el gen de la región VH con una secuencia guía añadida y el gen de la región CH1-CH2-CH3-T de cadena H de IgG1 humana, y el vector se denominó pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc monómero.

2-6. Preparación del vector pBluescriptII/LVH-CH1-CH2-CH3 (Figura 2-1-I)

Se trataron 0,5 µg de pBluescriptII/LVH (Figura 2-1-B) con *SalI* y *HindIII* a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 1,0 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1%, el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 0,43 kpb se recogió utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarlo con fragmentos del vector. Por separado, el vector pBluescriptII/CH1-CH2-CH3 (Figura 2-1-D) se trató con *SalI* y *HindIII* en las mismas condiciones. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pBluescriptII/CH1-CH2-CH3 tratado con las enzimas de restricción y se ligó con el gen LVH extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo, se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellos en los que se ha insertado un ADN para el gen de la región VH con una secuencia guía añadida y el gen de la región CH1-CH2-CH3 de la cadena H de la IgG1 humana, y el vector se denominó pBluescriptII/LVH- CH1- CH2- CH3.

2-7. Preparación de un vector pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc dímero (Fig. 2-2-J)

Se trataron 0,5 µg de pBluescriptII/LVH-CH1-CH2-CH3 (Figura 2-1-I) con *SalI* y *BamHI* a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 0,75 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis utilizando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% se recogió el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 1,42 kpb utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarlo con fragmentos del vector. Por separado, se trataron cuatro tipos de vectores pBluescriptII/SP-CH2-CH3-T que son diferentes en la longitud de espaciador de glicina/ serina (Figura 2-1-E) con *SalI* y *BamHI* bajo las mismas condiciones. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se combinaron 50 ng de pBluescriptII/SP-CH2-CH3-T tratado con las enzimas de restricción y se ligaron con el gen LVH-CH1-CH2-CH3 extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. Se seleccionó un vector que portaba un ADN insertado que tenía todo el gen de la región VL añadido con la secuencia guía y los genes para la región CH1-CH2-CH3 de cadena H IgG1 humana y la región CH2-CH3-T que contenía el espaciador peptídico de las colonias formadas. El vector resultante se denominó pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc dímero. Las secuencias de ADN de la región CH1-CH2-CH3 de la cadena H de IgG1 humana unidas a la región CH2-CH3-T se muestran en las SEQ ID NOs: 5 (0 espaciador), 7 (un espaciador), 9 (dos espaciadores) y 11 (tres espaciadores). Además, las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en las SEQ ID NOs: 6, 8, 10 y 12.

2-8. Preparación del vector pBluescriptII/SP-CH2-CH3-SP-CH2-CH3-T (Fig. 2-1-K)

Se trataron 0,5 µg de cada uno de los cuatro tipos de vectores pBluescriptII/SP-CH2-CH3-T que son diferentes en la longitud del espaciador de glicina/serina (Fig. 2-1-F) con *XbaI* y *NotI* a concentraciones finales de 0,75 U/µL y 0,5 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel

STANDARD 01 de agarosa al 1% se recogió el fragmento del inserto de ADN de aproximadamente 0,74 kpb utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarla con fragmentos del vector. Por separado, se trataron cuatro tipos de vectores pBluescriptII/ P-CH2-CH3 que son diferentes en la longitud de espaciador de glicina/serina (Fig. 2-1-G) con *XbaI* y *NotI* bajo las mismas condiciones. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/ cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pBluescriptII/SP-CH2-CH3 tratado con las enzimas de restricción y se ligaron con el gen SP-CH2-CH3 extirpado que tenía un espaciador peptídico de la misma longitud. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/ mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se han insertado dos unidades del gen CH2-CH3 que contiene el espaciador peptídico y el vector se denominó pBluescriptII/ SP-CH2-CH3-SP-CH2-CH3-T.

2-9. Preparación del vector pBluescriptII/Anti-CD20 Cadena H Fc trímero (Fig. 2-2-L)

Se trataron 0,5 µg de pBluescriptII/LVH-CH1-CH2-CH3 (Figura 2-1-I) con *SalI* y *BamHI* a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 0,75 U/µL, respectivamente. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis utilizando de agarosa al 1%, STANDARD 01 se recogió el fragmento de inserto de ADN de aproximadamente 1,42 kpb utilizando RECOCHIP con considerable cuidado para no contaminarla con fragmentos del vector. Por separado, se trataron cuatro tipos de vectores pBluescriptII/ SP-CH2-CH3-SP-CH2-CH3-T que son diferentes en la longitud del espaciador de glicina/ serina (Figura 2-1-K) con *SalI* y *BamHI* bajo la misma condiciones. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pBluescriptII/SP-CH2-CH3-SP-CH2-CH3-T tratadas con las enzimas de restricción y se ligaron con el gen LVH-CH1-CH2-CH3 extirpado. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembró toda la mezcla sobre una placa de medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. Se seleccionó un vector que portaba un inserto de ADN que tiene el gen de la región VH al cual se le añadió la secuencia guía, el gen de la región CH1-CH2-CH3 de cadena H de IgG1 humana y dos unidades del gen de la región CH2-CH3 que contenía el espaciador peptídico. El vector resultante se denominó pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc trímero. Las secuencias de ADN de la región CH1-CH2-CH3 de cadena H de IgG1 humana unida a dos unidades de las regiones CH2-CH3-T se muestran en las SEQ ID NOs: 13 (0 espaciador), 15 (un espaciador), 17 (dos espaciadores) y 19 (tres espaciadores). Además, las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en las SEQ ID NOs: 14, 16, 18 y 20.

2-10. Preparación del vector pcADN3.1/Anti-CD20 HC (Fig. 2-2-M, 2-2-N y 2-2-O)

Se transfirió el gen de la cadena H anti-CD20 quimérico de ratón/humano desde el vector pBluescriptII hasta el vector pcADN3.1/Zeo mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,5 µg de cada uno de pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc monómero (Fig. 2-1-H), pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc dímero (Fig. 2-2-J) y pBluescriptII/Anti-CD20 HC Fc trímero (Fig. 2-2-L) con *SalI* y *NotI*, ambos a una concentración final de 0,5 U/µL. Después de que toda la mezcla de reacción se sometiera a electroforesis usando gel de agarosa al 1% SATANDARD 01, se recogieron los fragmentos del inserto de ADN de aproximadamente 1,42 kpb, 2,16 kpb y 2,90 kpb, que cubren al gen Anti-CD20 HC Fc monómero, al gen Anti-CD20 HC Fc dímero, y al Anti-CD20 HC Fc trímero, respectivamente utilizando RECOCHIP. Por separado, se trató al vector pcADN3.1/Zeo con *XhoI* y *NotI*, ambos a una concentración final de 0,5 U/µL. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pcADN3.1/Zeo tratado con las enzimas de restricción y se ligaron con los genes Anti-CD20 HC extirpados. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a las mezclas de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembraron todas las mezclas sobre placas de medio LB que contenían 100 µg/mL de ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado el gen anti-CD20 HC, y los vectores se denominaron pcADN3.1/ Zeo/ Anti-CD20 HC Fc monómero, pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 HC Fc dímero, y pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 HC Fc trímero.

2-11. Preparación del vector pCAGGS1-dhfrN-L (Fig. 2-2-P)

Se insertó un espaciador en pCAGGS1-dhfrN, un vector de expresión que porta al promotor CAG y al gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr), mediante el siguiente procedimiento. Se trató PCAGGS1-dhfrN con *SalI* a una concentración final de 0,5 U/mL. Este fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Por separado, se sintetizaron dos cadenas de ADN (ADN sentido: GTCGACGCTAGCAAGGATCCTTGAATTCCTTAAGG (SEQ ID NO: 46), ADN antisentido:

GTCGACCTTAAGGAATT CAAGGATCCTTGCTAGCG (SEQ ID NO: 47)) y se combinaron a una concentración final de 1 μ M. El volumen total se ajustó a 10 μ L con agua MilliQ. Después de cinco minutos de calentamiento a 75°C, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente para enfriarla gradualmente. Se mezcló 1 μ L de esta solución y se ligó con 50 ng de pCAGGS1-dhfrN tratado con *Sa*I. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α a la mezcla de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después de reposar durante dos minutos sobre hielo, la mezcla completa se sembró en una placa con medio LB que contenía 100 μ g/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. Se seleccionó un vector pCAGGS1-dhfrN que contenía el espaciador como un inserto a partir de las colonias formadas. El vector resultante se denominó pCAGGS1-dhfrN-L. Como resultado de la inserción del espaciador, se generaron recientemente dos sitios *Sa*I en pCAGGS1-dhfrN, y la secuencia de los sitios de enzima de restricción se convirtió en 5'-*Sa*II-NheI-BamHI-EcoRI-AflIII-*Sa*I-3'.

2-12. Preparación del vector pCAGGS1-dhfrN-L/Anti-CD20 HC (Fig. 2-2-Q, 2-2-R y 2-2-S)

Se transfirió el gen de la cadena H anti-CD20 quimérico de ratón/humano desde el vector pcADN3.1/Zeo hasta el vector pCAGGS1-dhfrN-L mediante el siguiente procedimiento. Se trataron 0,5 μ g de cada uno de pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 HC Fc monómero, pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 HC Fc dímero, y pcADN3.1/Zeo/Anti-CD20 HC Fc trímero con *N*heI y *E*coRI a concentraciones finales de 0,8 U/ μ L y 0,5 U/ μ L, respectivamente. Después de que todas las mezclas de reacción se sometieran a electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1%, se recogieron los fragmentos del inserto de ADN aproximadamente de 1,42, 2,16 y 2,90 kpb, que cubrían el gen anti-CD20 HC Fc monómero, el gen anti-CD20 HC Fc dímero y el gen Anti -CD20 HC Fc trímero, respectivamente, utilizando RECOCHIP. Por separado, se trató el vector pCAGGS1-dhfrN-L con *N*heI y *E*coRI bajo las mismas condiciones. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se mezclaron 50 ng de pCAGGS1-dhfrN-L tratado con las enzimas de restricción y se ligaron con los genes Anti-CD20 HC extirpados. La ligación se llevó a cabo utilizando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 μ L de células competentes de *E. coli* DH5 α a las mezclas de reacción. Después de reaccionar durante 30 minutos sobre hielo, las células se sometieron a choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después se dejó reposar durante dos minutos sobre hielo y se sembraron todas las mezclas sobre placas de medio LB que contenían 100 μ g/mL de ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se había insertado el gen anti-CD20 HC, y los vectores se denominaron pCAGGS1-dhfrN-L/Anti-CD20 HC Fc monómero (Fig. 2-2-Q), pCAGGS1-dhfrN -L/Anti-CD20 HC Fc dímero (Fig. 2-2-R) y pCAGGS1-dhfrN-L/ Anti-CD20 HC Fc trímero (Fig. 2-2-S).

[Ejemplo 3] Selección de clones de células que expresan un anticuerpo modificado de células resistentes a G418 y MTX

3-1. Producción de transformantes

El plásmido pCAGGS1-neoN-L/Anti-CD20 LC preparado como se describe en el Ejemplo 1 y el plásmido pCAGGS1-dhfrN-L/Anti-CD20 HC, preparado como se describe en el Ejemplo 2, fueron linealizados usando *Pvu*I (TOYOBO) a una final concentración de 1,0 U/ μ L. Las células de la línea CHO DG44 se sembraron en placa a razón de 3×10^5 células/ pozo en una placa múltiple de 6 pozos (FALCON353046) usando IMDM (Sigma Aldrich) suplementado con suero fetal bovino al 10%, hipoxantina 0,1 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), Timidina 0,016 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. Las células se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% durante 24 horas. Se transfectaron nueve lotes de células de la línea CHO DG44 con 1,35 μ g del vector de expresión de cadena L y 1,35 μ g de cada uno de los nueve tipos de vectores de expresión de cadena H usando el reactivo de transfección Trans Fast (Promega). Las células se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% durante 48 horas. Los nueve tipos de anticuerpos producidos como resultado de la introducción de estos plásmidos y formas alteradas de los anticuerpos se ilustran esquemáticamente en la Fig. 4, donde M, D y T son diagramas esquemáticos para Fc monómero, dímero y trímero, respectivamente. D y T también incluyen formas alteradas que se produjeron para tener diferentes cantidades de espaciadores. Se produjeron D y T que tienen cero, una (SEQ ID NO: 48), dos (SEQ ID NO: 49) o tres (SEQ ID NO: 50) unidades del espaciador, donde la secuencia de glicina-glicina-glicina-serina (GGGGS) se definió como el espaciador unitario. Los productos respectivos se denominaron D0, D1, D2, D3, T0, T1, T2 y T3 (en lo sucesivo se utilizan las abreviaturas para los nueve tipos de anticuerpos y sus formas alteradas). Después de que los sobrenadantes de cultivo de las células transformadas se desecharan, las células se lavaron con PBS y luego se añadió 1 mL de Solución de Tripsina-EDTA (Sigma Aldrich). Las células se incubaron a 37°C durante tres minutos. Después de confirmar el desprendimiento celular de la placa y la forma esférica, las células se suspendieron en medio de selección IMDM suplementado con suero fetal bovino al 10%, G418 0,8 mg/mL, metotrexato 500 nM, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina. Las células de cada transformante se sembraron en placas y se cultivaron en dos placas múltiples de 96 pozos de fondo plano (FALCON353072) a razón de 3×10^3 células/pozo (volumen de medio: 100 μ L/ pozo).

3-2. Anti-CD20 y determinación de las concentraciones

Las concentraciones de anticuerpo en sobrenadantes de cultivo se determinaron mediante inmunoensayo enzimático (ELISA). Se diluyó un anticuerpo anti-cadena y humano de cabra (Biosource) a 0,5 µg/mL con PBS. Se tomaron alícuotas de 50 µL del anticuerpo inmovilizado en una placa de 96 pozos (FALCON353912) y se incubaron a 4° C durante la noche. Se desechó la solución de anticuerpo y se bloqueó la placa añadiendo 150 µL de solución de PBS que contenía BSA al 0,1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e incubando a 37°C durante dos horas. La solución de bloqueo se descartó y los sobrenadantes del cultivo celular diez veces diluidos con PBS se dividieron en alícuotas (100 µL) en los pozos correspondientes. La placa se incubó entonces a 37°C durante dos horas. Después de descartar los medios de cultivo diluidos, los pozos se lavaron tres veces con 100 µL de solución de PBS que contenía 0,05% de Tween20 (MP Biomedicals) (PBST). Se diluyó un anticuerpo anti-cadena y humano de cabra marcado con peroxidasa (Sigma Aldrich) hasta 0,5 µg/mL con PBS que contenía BSA al 0,1%, y luego se dividió en alícuotas (50 µL) en cada pozo. La placa se incubó a 37°C durante una hora. Después de descartar la solución y de lavar los pozos tres veces con PBST, se añadieron 50 µL de solución de sustrato (regulador de citrato sódico (pH 5,0) que contenía dihidrocloruro de o-fenilendiamina al 0,4% (Sigma Aldrich) y 0,003% de H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) se dividió en alícuotas y se midió A450 con un lector de microplacas (BIO-RAD Modelo 550).

3-3. Clonación celular

Cuatro días después de que los transformantes se sembraron en placas de 96 pozos, se añadieron 100 µL de un medio de selección. Una semana después de la adición del medio, se determinaron las concentraciones de anticuerpo en sobrenadantes de cultivo mediante el método descrito en el Ejemplo 3-2. De 192 pozos, se seleccionaron doce pozos que presentaban altos valores A450 para cada transformante. Estas células se tripsinizaron, y luego se combinaron utilizando el medio de selección. De nuevo, las células se sembraron en placas sobre una placa múltiple de 96 pozos a razón de 3 células/pozo y dos placas múltiples de 96 pozos a razón de 1 célula/pozo, en total tres placas de 96 pozos. Las células se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% (volumen del medio: 100 µL/pozo). Dieciséis días después de la siembra en placa, se seleccionaron pozos con una sola colonia y se determinaron las concentraciones de anticuerpo en los sobrenadantes del cultivo. Se seleccionaron 12 pozos que presentaban un alto valor A450 y se trataron con tripsina. A continuación, las células se sembraron en placas sobre placas múltiples de 24 pozos usando el medio de selección (volumen de medio: 1 mL pozo). De nuevo, se determinaron las concentraciones del anticuerpo en los sobrenadantes del cultivo cuando las células se hicieron crecer hasta confluencia. Se seleccionaron seis pozos que exhibían un alto valor de A450 y se trataron con tripsina. A continuación, las células se sembraron en placas sobre una placa múltiple de 6 pozos (volumen de medio: 4 mL/pozo). De nuevo, se determinaron las concentraciones del anticuerpo en los sobrenadantes del cultivo cuando las células crecieron hasta confluencia. Se seleccionaron tres pozos que presentaban un alto valor de A450 y se trataron con tripsina. A continuación, las células se sembraron por separado en placas de 10 cm (FALCON353003) (volumen del medio: 10 mL). De estos, se acondicionó un clon para un medio libre de suero, y los otros dos clones se congelaron y se almacenaron.

3-4. Acondicionamiento del medio libre de suero

Las células cultivadas hasta confluencia en placas de 10 cm se tripsinizaron, y luego se suspendieron 2x10⁶ células en 10 mL de un medio mixto que consistía en 2,5 mL de medio CD CHO (GIBCO) y 7,5 mL de IMMD suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células se sembraron en placas de 10 cm (relación de mezcla: 25%: 75%). Se asumió que las células estaban acondicionadas al medio mixto cuando crecieron hasta confluencia. Posteriormente, se pasaron las células mientras se variaba la relación de mezcla entre el medio CD CHO y el IMDM suplementado con suero fetal bovino al 10% al 50%:50%, 75%:25% y 90%:10% en sucesión.

[Ejemplo 4] Cultivo a gran escala de células productoras de anticuerpos y purificación de anticuerpos expresados

4-1. Cultivo a gran escala de células productoras de anticuerpos

Las placas que expresan el anticuerpo preparadas como se describe en el Ejemplo 3 se sembraron sobre un total de siete placas de 15 cm a razón de 10⁶ células/placa (volumen de medio: 20 mL) usando un medio mixto donde la relación de mezcla entre medio CD CHO y IMDM suplementado con suero fetal bovino al 10% fue de 90% a 10%. Cuando las células se crecieron hasta confluencia, el medio se descartó y se lavaron las células tres veces con 20 mL de PBS. A continuación, se añadieron 30 mL de medio CD CHO y las células se cultivaron a 37°C con CO₂ al 8% durante diez días.

4-2 Purificación de anticuerpos de sobrenadantes de cultivo usando agarosa de proteína A

Los sobrenadantes de cultivo de células que expresan anticuerpos se recogieron en cuatro tubos cónicos de 50 mL y luego se centrifugaron a 3.000 g durante 30 minutos. Los sobrenadantes se recogieron en un matraz Erlenmeyer con cuidado de no contaminarlos con los sedimentos. Se equilibró una columna llena con 1 mL de agarosa de

5 proteína A (Santa Cruz) con 5 mL de PBS. El sobrenadante del cultivo completo se cargó luego en la columna. La columna se lavó con 5 mL de PBS para eliminar materiales adsorbidos no específicamente, y después se eluyó con 3 mL solución de elución de glicina 0,1 M (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)/ácido clorhídrico (pH 2,7). Se recogieron fracciones de 300 μ L. Inmediatamente, se añadieron 30 μ L de solución neutralizante (pH 9,0) que consistía de Tris (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y ácido clorhídrico a las fracciones recolectadas y se mezclaron las soluciones combinadas mediante inversión. Después de la electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y tinción con CBB (BIO-RAD, BIO-Safe Coomassie), la cuantificación se realizó utilizando Image J (Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.), un programa analítico para electroforesis. El resultado mostró que los rendimientos de los nueve tipos de anticuerpos fueron de 2 a 4 μ g/mL de medio.

10 4-3. Etapa de purificación secundaria usando cromatografía de filtración en gel

15 Los anticuerpos se sometieron a purificación secundaria utilizando un sistema HPLC (JASCO CO.) con una columna de Protein Pak 300SW (Waters). El caudal de la solución de elución (regulador de fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contiene cloruro de sodio 0,15 M) fue de 1 mL/min. Una prueba cualitativa de Rituxan (RTX, peso molecular, 145 kDa, Chugai Pharmaceutical Co.) mostró un tiempo de retención de 7,5 minutos. Con base en este resultado, se inyectaron 100 μ L de cada uno de los nueve tipos de anticuerpos (100 μ g/mL) por cuadruplicado y se recogieron los picos de las fracciones: M (154 kDa) a un tiempo de retención de 7,8 min, D0 (208 kDa) a 7,0 min, D1 (154 kDa) a 7,7 min, D2 (154 kDa) a 7,5 min D3 (208 kDa) a 6,7 min, T0 (262 kDa) a 6,5 min, T1 (262 kDa) a 6,3 min, T2 (262 kDa) a 6,2 min, y T3 (262 kDa) a 6,2 min. El volumen de cada anticuerpo recogido fue de aproximadamente 4 mL. Los cromatogramas se muestran en la Fig. 5.

20 4-4. Concentración usando ultrafiltración

25 Se vierte 1 mL de Tween 20 al 5% en unidades de filtro de Amicon Ultra-4 (Millipore) cuyo corte molecular es de 50 kDa. Las unidades se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una hora. La solución acuosa de Tween20 se desechó y las unidades de filtro se lavaron tres veces con 1 mL de agua MilliQ. Se cargaron 4 mL de cada una de las soluciones recogidas en la etapa de purificación secundaria usando filtración en gel sobre las unidades de filtro. Las unidades se centrifugaron a 3.000 g y 25°C durante 25 minutos. Se recogieron las soluciones que se concentraron hasta aproximadamente 100 μ L. Las concentraciones se determinaron mediante HPLC cuantitativa usando RTX como sustancia estándar.

[Ejemplo 5] Análisis estructural de los anticuerpos

5-1. Análisis SDS-PAGE

30 Se preparó gel de poli(acrilamida) al 10% con la siguiente composición. El gel de separación se preparó mezclando 1,9 mL de agua MilliQ, 1,7 mL de acrilamida al 30% (acrilamida al 29% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), N, N'-metileno bis acrilamida al 1% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 1,3 mL de regulador Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 50 μ L de SDS al 10% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 50 μ L de APS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 3 μ L de TEMED (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Esto se vertió inmediatamente en una placa de gel teniendo cuidado de no introducir burbujas de aire. Se colocó 0,5 mL de agua MilliQ en la parte superior, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la polimerización, se desechó el agua Milli-Q colocada. El gel de concentración se preparó mezclando 1,4 mL de agua MilliQ, 0,25 mL de acrilamida al 30%, 0,33 mL de regulador Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 20 μ L de SDS al 10%, 20 μ L de APS y 2 μ L de TEMED, y esto se vertió en la placa de gel. Se colocó un peine y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para dejar que el gel se polimerizara. Se ajustaron 300 ng de cada anticuerpo a 10 μ L con la solución de elución utilizada para HPLC y luego se ajustaron a 20 μ L añadiendo regulador de muestra de Laemmli (BIO-RAD) que contenía 2-mercaptoetanol al 10% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) al mismo. Después de agitación tipo vórtice, las muestras se trataron térmicamente a 95°C durante cinco minutos y se aplicaron en los pozos del gel de acrilamida al 10%. La SDS-PAGE se llevó a cabo a una corriente constante de 0,02 A según el método de Laemmli. La membrana de PVDF (Pall Corporation) se remojó completamente en metanol, y luego se añadió regulador de transferencia (Tris al 0,78%, glicina al 3,6%) de forma que el contenido de metanol fue 20%. El gel después de la electroforesis se colocó en la parte superior y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se colocaron dos láminas de papel de filtro embebidas con el regulador de transferencia sobre la celda de transferencia semiseca SD Trans-Blot (BIO-RAD), y la membrana de PVDF y el gel se colocaron sobre el mismo en este orden. Se colocaron otras dos hojas de papel de filtro empapadas con el regulador de transferencia y se llevó a cabo la transferencia tipo Western a una corriente constante de 0,2 A durante 30 minutos. Después de la transferencia, la membrana de PVDF se sumergió en una solución de PBST que contenía leche desnatada al 5% (Snow Brand) y se bloqueó a 4°C durante la noche. La membrana de PVDF se intercaló entre hojas de vinilo y se sumergió en 1 mL de solución de bloqueo que contenía 0,13 μ g/mL de anti-IgG (H+L) humana de cabra marcada con HRP (Chemicon) y 0,33 μ g/mL de anti-cadena Kappa humana de cabra marcada con HRP (Sigma Aldrich) con agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Se retiró la membrana de PVDF de las láminas de vinilo y se agitó en PBST durante cinco minutos. Este tratamiento de lavado de la membrana de PVDF se repitió tres veces. La membrana de PVDF se intercaló entre hojas de vinilo y se añadió 1 mL de "reactivos de detección Western Blot de ECL y sistema de análisis" (Amersham Biosciences). Una

película de rayos X (Kodak) se expuso durante un minuto en una habitación oscura. La película se sumergió en solución RENDOL (Fujifilm) hasta que las bandas pudieron confirmarse, y luego se enjuagó con agua del grifo y se fijó con solución RENFIX (Fujifilm). El resultado se muestra en la figura. 6.

5-2. Análisis por HPLC

5 Las moléculas de anticuerpo se analizaron por HPLC usando Protein Pak 300SW. Se utilizó una solución de elución (regulador fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía cloruro de sodio 0,15 M) a una velocidad de 1 mL/min. Se obtuvieron cromatogramas después de inyectar aproximadamente 600 ng de cada anticuerpo (Figura 7). Los resultados de los análisis de SDS-PAGE y HPLC demostraron que los productos purificados de D0 y D3 tenían dos de la porción de bisagra y el dominio Fc enlazados en tándem, mientras que los componentes principales de D1 y D2 eran moléculas con solamente uno de ellos. Mientras tanto, T0 contenía tres de la porción de bisagra y el dominio Fc en tándem, mientras que T1, T2 y T3 eran mezclas de moléculas que tenían tres de estos en tándem y moléculas que sólo tenían dos de estos.

[Ejemplo 6] Ensayo de unión de CD20 de anticuerpos usando citometría de flujo

15 Las células Ramos de linfoma de Burkitt humano positivas para CD20 se cultivaron usando RPMI1640 que contenía suero fetal bovino inactivado por calor al 10%, piruvato sódico 1 mM (Wako), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin a 37°C bajo CO₂ al 5%. La solución de cultivo de células Ramos se centrifugó a 600 g durante cinco minutos. Después de retirar el medio, las células se suspendieron en un volumen apropiado de medio. Después de otra centrifugación a 600 g durante cinco minutos, se retiró el medio. Se añadieron 5 mL de regulador FACS (PBS que contenía BSA al 0,1% y NaN₃ al 0,02%) para suspender las células, y ésta se dejó sobre hielo y se bloqueó durante 30 minutos. El sobrenadante se retiró después de centrifugación a 600 g durante cinco minutos, se suspendieron las células a razón de 5 x 10⁶ células/mL en regulador FACS y se tomaron alícuotas de 100 µL por tubo de 1,5 mL. El anticuerpo anti-CD20 preparado y RTX se añadieron a una concentración final de 50 nM. Además, se añadió Herceptina (HER) (Trastuzumab, 148 kDa, Chugai Pharmaceutical Co.) a una concentración final de 30 nM, se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos para dejar que los anticuerpos reaccionaran con las células, y luego se centrifugó a 600 g durante cinco minutos. Se eliminaron los sobrenadantes y se lavaron las células añadiendo 500 µL de regulador FACS. Este proceso se repitió dos veces para eliminar completamente los anticuerpos no reaccionados. Las células se suspendieron en 100 µL de regulador FACS que contenía 20 µg/mL de anticuerpo anti-cadena Kappa humana de cabra marcado con FITC (Biosource International) y se dejó reposar sobre hielo en la oscuridad durante 30 minutos. Las células se lavaron con el método descrito anteriormente, suspendidas en 100 µL de regulador FACS, se filtraron a través de una malla con un tamaño de orificio de 59 µm y se transfirieron a tubos FACS. La actividad de unión de CD20 de cada anticuerpo se analizó mediante medición de fluorescencia utilizando FACScan (Becton Dickinson) (Figura 8).

35 Todos estos anticuerpos, que comprenden la región variable del anticuerpo anti-CD20 monoclonal de ratón 1F5 y una región constante humana, se unen a células Ramos. La cantidad de T0, T1, T2, T3, D1, D2 y D3 unidos fue ligeramente mayor que aquella de D0. La cantidad de M unida fue ligeramente inferior a la de D0.

[Ejemplo 7] Ensayo de unión de receptor por ELISA usando FcγR recombinante

7-1. Preparación de FcγR recombinante

(i) Construcción del vector pBluescriptII/Gly-His₆-GST

40 Se insertó una secuencia del gen GST en pBluescriptII mediante el siguiente procedimiento: se combinaron sobre hielo 4 µL del Regulador 5x adjunto, 1,6 µL de dNTP 2,5 mM, 1 µL de cebador directo 10 µM (5'-ATCTATCTAGAGGCC ATCACCATCACCATCACATGTCCCCTATACTAGGTTATTG-3' (SEQ ID NO : 51) que tiene un sitio XbaI (subrayado) y una secuencia Gly-His₆ (posiciones 12 a 32 en la SEQ ID NO: 51)) y 1 µL del cebador inverso 10 µM (5'-ATTAAT CAGCGGCCGCTCACGGGGATCCAACAGAT-3' SEQ ID NO: 52) con un sitio NotI (subrayado) para amplificar la secuencia GST, 100 ng de pGEX-2TK como plantilla y 0,2 µL de 5 U/µL del sistema de PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 µL añadiendo agua MilliQ. La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: calentamiento a 95°C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de tres pasos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La solución de reacción se sometió a electroforesis usando un gel STANDARD 01 de agarosa al 1%. Se recogió una banda de aproximadamente 0,70 kpb utilizando RECOCHIP. Este fragmento de ADN se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. El fragmento de ADN se trató con XbaI y NotI a concentraciones finales de 0,75 U/µL y 0,5 U/µL, respectivamente, y se ligó con 50 ng de pBluescriptII tratado de forma similar a temperatura ambiente durante 30 minutos usando 1,5 U de ADN ligasa T4. Se añadieron 100 µL de células competentes de E. coli DH5α a la solución de reacción, ésta se dejó en hielo durante 30 minutos y se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después de dos minutos de incubación sobre hielo, la cantidad total se colocó sobre una placa de cultivo LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias

formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado la secuencia de Gly-His₆-GST, y este vector se denominó pBluescriptII/Gly-His₆-GST.

(ii) Construcción del vector pBluescriptII/FcyR/Gly-His₆-GST

5 Las secuencias génicas para los dominios extracelulares de cuatro tipos de FcyR, a saber FcyRIA, FcyRIIA, FcyRIIB y FcyRIIIA, se insertaron en pBluescriptII/Gly-His₆-GST mediante el siguiente procedimiento: se combinaron sobre hielo 4 µL del regulador 5x adjunto, 1,6 ML de dNTP 2,5 mM, 1 µL de cebador directo 10 µM (FcyRIA: 5'-CCCCAAGCTTGCCG CCATGTGGTTCTTGACAACCTC-3' (SEQ ID NO: 53) que tiene un sitio *Hind*III (subrayado), FcyRIIA: 5'-AACAAAAGC TTGCCGCCATGGAGACCCAAATGTCT-3' (SEQ ID NO: 54) que tiene un sitio *Hind*III (subrayado); FcyRIIB: 5'-CCCC AAGCTTGCCGCCATGGGAATCCTGTCATTCT-3' (SEQ ID NO: 55) que tiene un sitio *Hind*III (subrayado); y FcyRIIIA: 5'-ATATGAATTCGCCGCCATGTGGCAGCTGCTC-3' (SEQ ID NO: 56) que tiene un sitio *Eco*RI (subrayado)) y 1 µL de cebador inverso 10 µM (FcyRIA: 5'-GCGAATCTAGAATGAAACCAGACAGGAG-3' (SEQ ID NO: 57) que tiene un sitio *Xba*I (subrayado); FcyRIIA: 5'-ACGATTCTAGACATTGGTGAAGAGCTGCC-3' (SEQ ID NO: 58) que tiene un sitio *Xba*I (subrayado); FcyRIIB: 5'-ACGATTCTAGACATCGGTGAAGAGCTGGG-3' (SEQ ID NO: 59) que tiene un sitio *Xba*I (subrayado); y FcyRIIIA: 5'-CGGCATCTAGATTGGTACCCAGGTGGAAAG-3' (SEQ ID NO: 60) que tiene un sitio *Xba*I (subrayado)) para amplificar la secuencia del dominio extracelular de FcyR, 100 ng de un vector en el cual se ha insertado el gen FcyR de longitud completa como una plantilla, y 0,2 µL de 5 U/µL sistema de PCR Expand High Fidelity^{PLUS}. El volumen total se ajustó a 20 µL añadiendo agua MilliQ. La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: calentamiento a 95°C durante 2 minutos, seguido de 10 ciclos de tres pasos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La solución de reacción se sometió a electroforesis usando un gel STANDARD 01 de agarosa al 1%. Se recogieron bandas de aproximadamente 0,88 kpb, 0,65 kpb, 0,65 kpb y 0,73 kpb para FcyRIA, FcyRIIA, FcyRIIB y FcyRIIIA usando RECOCHIP, respectivamente. Estos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con isopropanol. Los fragmentos de ADN para FcyRIA, FcyRIIA y FcyRIIB se trataron con *Hind*III y *Xba*I a concentraciones finales de 1,0 U/µL y 0,75 U/µL, respectivamente, mientras que FcyRIIIA se trató con *Eco*RI y *Xba*I a concentraciones finales de 0,5 U/µL y 0,75 U/µL, respectivamente, y se ligaron con 50 ng de pBluescriptII/Gly-His₆-GST tratado similarmente a temperatura ambiente durante 30 minutos usando 1,5 U de ADN ligasa T4. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la solución de reacción, ésta se dejó en hielo durante 30 minutos y se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después de dos minutos de incubación sobre hielo, la cantidad total se colocó sobre una placa de cultivo LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado el gen para el dominio extracelular de FcyR y el vector se denominó pBluescriptII/FcyR/Gly-His₆-GST.

(iii) Construcción del vector pcADN3.1/Zeo/FcyR/Gly-His₆-GST

35 La secuencia de FcyR/Gly-His₆-GST se transfirió desde el vector pBluescriptII al vector pcADN3.1/Zeo mediante el siguiente procedimiento: se trataron 0,5 µg de pBluescriptII/FcyR/Gly-His₆-GST con *Apal* y *Not*I, ambos a una concentración final de 0,5 U/mL. Después de la electroforesis usando gel STANDARD 01 de agarosa al 1% se recogieron bandas de aproximadamente 1,58 kpb, 1,35 kpb, 1,35 kpb y 1,43 kpb para FcyRIA, FcyRIIA, FcyRIIB y FcyRIIIA usando RECOCHIP, respectivamente. Por separado, el vector pcADN3.1/Zeo se trató con *Apal* y *Not*I, ambos a una concentración final de 0,5 U/µL. Ambos fragmentos de ADN se purificaron mediante extracción con fenol/ cloroformo y precipitación con alcohol isopropílico. Se combinaron 50 ng de pcADN3.1/Zeo tratado con enzima de restricción con el gen de FcyR/Gly-His₆-GST extirpado y se llevó a cabo la ligación usando 1,5 U de ADN ligasa T4 a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la solución de reacción, ésta se dejó en hielo durante 30 minutos y se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Después de dos minutos de incubación sobre hielo, la cantidad total se colocó sobre una placa de cultivo LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se había insertado el gen FcyR/Gly-His₆-GST, y el vector se denominó pcADN3.1/ Zeo/FcyR/Gly-His₆-GST.

(iv) Construcción del vector pcADN3.1/Zeo/FcyRIIIA(F)/Gly-His₆-GST

50 El vector pcADN3.1/Zeo/FcyRIIIA(Gly-His₆-GST) construido en (iii) era un FcyRIIIA de tipo V. El vector pcADN3.1/Zeo/ FcyRIIIA(F)/Gly-His₆-GST se preparó por mutagénesis dirigida al sitio utilizando el siguiente procedimiento: se combinaron sobre hielo 2 µL del regulador 10x adjunto, 1,6 µL de dNTP 2,5 mM, 0,5 µL de sentido 10 µM (5'-TCTGC AGGGGGCTTTTGGGAGTAAAT-3' (SEQ ID NO: 61) y 0,5 µL de cebador antisentido 10 µM (5'-ATTTTTACTCCCAA AAAGCCCCCTGCAGA-3' (SEQ ID NO: 62)) para mutagénesis, 10 ng de pcADN3.1/ Zeo/FcyRIIIA (157V)/ Gly-His₆-GST como plantilla, y 0,4 µL de 2,5 U/µL de Pfu polimerasa. El volumen total se ajustó a 20 µL añadiendo agua MilliQ. La PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones: calentamiento a 95°C durante 2 minutos, seguido por 14 ciclos de tres pasos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 68°C durante 8 minutos. Después de la reacción, se añadieron 0,3 µL de 20 U/µL de *Dpn*I a la solución de reacción, y ésta se incubó a 37°C durante una hora. Se añadieron 100 µL de células competentes de *E. coli* DH5α a la solución de reacción, ésta se dejó en hielo durante 30 minutos y se sometió a choque térmico a 42°C durante 45

segundos. Después de dos minutos de incubación sobre hielo, la cantidad total se colocó sobre una placa de cultivo LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. La placa se incubó a 37°C durante la noche. A partir de las colonias formadas, se seleccionaron aquellas en las que se ha insertado la secuencia FcγRIIIA(F)/ Gly-His₆-GST, y el vector se denominó pcADN3.1/Zeo/FcγRIIIA(F)/Gly-His₆-GST.

5 (v) Transferencia de genes a 293T y cultivo

Se sembraron en placa 1 x 10⁷ células de 293T sobre un placa de cultivo de células de 150 mm y se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% durante 24 horas. Las células se transfectaron con 48 µg de pcADN3.1/Zeo/FcγR/Gly-His₆-GST utilizando reactivo de transfección TransFast y se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% durante 24 horas. El medio se descartó. Las células tripsinizadas se suspendieron en 120 mL de medio de selección DMDM que contenía suero fetal bovino al 10%, 50 µg/mL de zeocina, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina y se sembraron en placas de cultivo de células de 150 mm. Las células se cultivaron después a 37°C bajo CO₂ al 5% durante siete días.

10 (vi) Purificación del receptor Fcγ

Los sobrenadantes del cultivo se recogieron en tubos cónicos de 50 mL, se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos y se recogieron en un matraz Erlenmeyer teniendo cuidado de no recoger los sedimentos. Se equilibró una columna empacada con 1 mL de agarosa de Ni-NTA cargando 5 mL de regulador de unión Native, después se cargó el sobrenadante de cultivo total. La columna se lavó cargando 5 mL de regulador de lavado Native para eliminar los materiales no adsorbidos específicamente. A continuación, se cargó el regulador de elución Native y se recogieron 400 µL por fracción. Después de SDS-PAGE, se realizaron tinciones con BIO-Safe Coomassie y cuantificación usando Image J, un programa de análisis electroforético.

15 7-2. Medición de la unión al receptor Fc

El FcγR preparado (FcγRIA, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA^{Val} y FcγRIIIA^{Phe}) se ajustó a 4 µg/mL con PBS, se dividió en alícuotas en placas de 96 pozos a 50 µL por pozo y se dejó en reposo a 4°C durante la noche. Después se desecharon las soluciones y se añadieron a cada pozo 180 µL de regulador de ensayo de ELISA (BSA al 0,5%, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,05%, TBS 25 mM (pH 7,4)). Las placas se dejaron reposar y se bloquearon a 37°C durante 2 horas. Se desecharon las soluciones, se añadieron 50 µL de soluciones de anticuerpo diluidas en serie con regulador de ensayo de ELISA a cada pozo y se dejó reaccionar a 37°C durante dos horas. Las soluciones de anticuerpo se descartaron y los pozos se lavaron tres veces con 150 µL de regulador de ensayo de ELISA. 50 µL de regulador de ensayo de ELISA que contenía 0,33 µg/mL de anticuerpo de anti-cadena Kappa humana de cabra marcado con HRP en cada pozo y se dejó reposar a 37°C durante una hora. Después de retirar la solución de anticuerpo, los pozos se lavaron tres veces con 150 µL de regulador de ensayo de ELISA. Se tomaron alícuotas de 50 µL de una solución de sustrato (regulador de citrato de sodio (pH 5,0) que contenía diclorhidrato de o-fenilendiamina al 0,4% y H₂O₂ al 0,003%) se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante diez minutos. A continuación, se llevaron a cabo mediciones a A450 utilizando un lector de microplacas (Figura 9).

35 Como se muestra en la Fig. 9-1, todos los anticuerpos tenían afinidad comparable por FcγRIA. Ab50, la concentración de anticuerpo que muestra el 50% del valor máximo de unión del anticuerpo, estaba en el intervalo de 0,1 nM a 0,3 nM para todos los anticuerpos modificados.

40 Como se muestra en la Fig. 9-2, con respecto a FcγRIIA, la intensidad de unión de los anticuerpos modificados estaba en el siguiente orden: T1, T2, T3>T0, D3>D0>D1, D2>M. Los trímeros eran los más fuertes, los dímeros eran los siguientes, y M fue el más débil. El Ab50 de los trímeros difirió de aquel de M por alrededor de 100 veces. El Ab50 de D3 fue también aproximadamente 60 veces menor que aquel de M. Cuando se compararon los trímeros, se encontró que la actividad de unión de T1, T2 y T3, que tienen espaciadores, era más fuerte que la de T0, que no tiene espaciador. Con los dímeros también, la actividad de D3 fue más fuerte que aquella de D0. La razón por la que D1 y D2 eran más débiles es probablemente debida a que había más monómeros que dímeros contenidos en las muestras.

45 Como se muestra en la Fig. 9-3, igualmente con respecto a FcγRIIB, las actividades de unión al receptor de los anticuerpos modificados estaban en el siguiente orden: trímeros> dímeros> M. Con este receptor también, T1, T2 y T3, que tienen espaciadores, eran más fuertes que T0, que no tiene espaciador. No hubo diferencias entre D3 y D0. El Ab50 de T1, T2 y T3 fue de aproximadamente 0,5 nM, mientras que el de D3 fue de aproximadamente 5 nM y aquel de M fue de aproximadamente 50 nM.

50 Existen variantes genéticas de FcγRIIIA, que son los tipos en los que el aminoácido en la posición 158 es valina o fenilalanina. Como se muestra en la Fig. 9-4, igualmente con respecto a FcγRIIIA^{Val}, la intensidad de unión mostrada fue la siguiente: T1, T2, T3>T0, D3, D0>D2, D1, M (Figura 9-4). El Ab50 de T1, T2 y T3 fue aproximadamente de 0,5 nM; el Ab50 de T0, D3 y D0 fue aproximadamente de 2 nM; y el Ab50 de D1, D2 y M fue aproximadamente de 30

nM. La afinidad por el otro tipo de receptor, FcγRIIIA^{Phe}, fue más débil que aquel para FcγRIIIA^{Val}; Sin embargo, el orden Trímeros> Dímeros> M fue el mismo (Fig. 9-5).

[Ejemplo 8] Ensayo de actividad ADCC

8-1. Preparación de células efectoras PBMC

5 Se preparó una suspensión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como células efectoras mediante el siguiente procedimiento: se recogieron 100 mL de sangre de adultos sanos. Se añadieron 80 mL de Dextrano 200000 al 3,5% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y solución acuosa al 0,9% de cloruro de sodio a 100 mL de la sangre, se mezcló por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos de modo que la mayor parte de los eritrocitos se precipitaron. Se transfirieron 25 mL del sobrenadante a un tubo cónico de 50 mL y se añadió a éste 25 mL del medio RPMI1640. La centrifugación se llevó a cabo a 400 g durante 10 minutos para sedimentar las células, después se desechó el sobrenadante. Se añadieron 20 mL de medio RPMI1640 para resuspender las células. La centrifugación a 400 g durante diez minutos se llevó a cabo nuevamente para sedimentar las células, después se desechó el sobrenadante. Las células se suspendieron en 30 mL de medio RPMI1640 y se colocaron sobre 15 mL de Ficoll-Paque Plus (Amersham) teniendo cuidado de no perturbar la interfase. Después de la centrifugación a 400 g durante 30 minutos, la capa opaca en forma de banda blanca formada entre el plasma y la solución de separación se transfirió a un tubo cónico diferente de 50 mL. Se añadieron 20 mL de medio RPMI1640 y se centrifugó a 400 g durante 10 minutos. Después de confirmar el sedimento, el sobrenadante se desechó. Se añadieron 15 mL de regulador de ensayo de ADCC (RPMI 1640 que no contenía rojo fenol, suero fetal bovino al 1%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM (pH 7,2), 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin), y se repitió la centrifugación a 400 g durante diez minutos. El sedimento se confirmó y se suspendió a razón de 5×10^6 células/mL en regulador de ensayo de ADCC, y se usó como suspensión de PBMC.

8-2. Medición de la actividad de ADCC

25 Como células objetivo, se suspendieron células Ramos a razón de 2×10^5 células/mL en regulador de ensayo de ADCC, y se dividió en alícuotas de 50 µL por pozo en placas múltiples de 96 pozos de fondo redondo (FALCON 353077) (10^4 células/pozo). Cada anticuerpo se diluyó en serie con regulador de ensayo de ADCC, se añadieron 50 µL a las placas y se incubó a 37°C bajo CO₂ al 5% durante 30 minutos. Se añadieron a cada pozo 50 µL de la suspensión de PBMC preparada en (1), y se incubó a 37°C con CO₂ al 5% durante cuatro horas ($2,5 \times 10^5 \wedge 5$ células/pozo, efector: objetivo = 25:1). La centrifugación se llevó a cabo a 300 g durante 10 minutos y se transfirieron 50 µL del sobrenadante a una placa de 96 pozos. Se preparó una solución de reacción del kit de detección citotóxica (Roche) y se dividió en alícuotas de 50 µL en la placa de 96 pozos. Después de dejar que reaccionara durante 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 450 nm. Basándose en la A450 obtenida, el cálculo se llevó a cabo utilizando la siguiente fórmula: "citotoxicidad (%) = $100 \times (\text{muestra de ensayo} - \text{control objetivo} - \text{control efector}) / (\text{control de Tween al 2\%} - \text{control objetivo})$ ". El control objetivo es una muestra a la que se le añadió regulador de ensayo de ADCC en lugar de la etapa de adición de las células efectoras. El control efector es una muestra a la que se le añadió regulador de ensayo de ADCC en lugar de la etapa de adición de las células objetivo.

Como se muestra en la Fig. 10, T1, T2 y T3 exhibieron la actividad más fuerte de ADCC, y T0 y D3 vinieron a continuación. D1, D2 y M exhibieron sólo una actividad débil de muerte celular, incluso a la concentración de anticuerpos más alta. El Trastuzumab, que no se une a las células objetivo, no mostró citotoxicidad.

[Ejemplo 9] Ensayo de actividad de CDC

40 Para usar como células objetivo, se cultivaron células Ramos de linfoma de Burkitt humano positivas para CD20 en RPMI1640 que contenía suero fetal bovino al 10% inactivado por calor, piruvato sódico 1 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin a 37°C bajo CO₂ al 5%. Las células Ramos se lavaron con regulador RHB (RPMI 1640 (Sigma Aldrich) que no contenía rojo fenol, HEPES 20 mM (pH 7,2) (Dojindo Laboratories)), L-glutamina 2 mM (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), BSA al 0,1% 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomycin), ajustado a 10^6 células/mL y se dividió en alícuotas de 50 µL sobre una placa múltiple de 96 pozos de fondo plano (5×10^4 células/pozo). Se añadieron 50 µL de anticuerpos diluidos en serie con regulador RHB y 50 µL de suero fresco de conejo bebe (Cedarlane Laboratories) 12 veces diluido también con regulador RHB y se incubaron a 37°C bajo CO₂ al 5% durante dos horas. Se añadieron 50 µL de Alamar Blue (AccuMed International) a cada pozo y se incubó a 37°C bajo CO₂ al 5% durante la noche. Al día siguiente, se retiró la cubierta de la placa y, utilizando un lector de placa de fluorescencia (CYTOFLUOR Series 4000, PerSeptive Biosystems), se irradió una luz de excitación de 530 nm y se midió la fluorescencia a 590 nm. A partir de los datos obtenidos como RFU (Unidad Relativa de Fluorescencia), los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente fórmula: citotoxicidad (%) = $100 \times (\text{RFU de fondo} - \text{RFU de la muestra de prueba}) / \text{RFU de fondo}$. La RFU de fondo corresponde la RFU obtenida a partir de un pozo en el cual se añadió regulador RHB en lugar de anticuerpos en la etapa de adición de los anticuerpos.

Como se muestra en la Fig. 11, no se observó ningún cambio en la actividad de CDC por las alteraciones. Mientras tanto, Trastuzumab utilizado como control no mostró citotoxicidad.

Aplicabilidad Industrial

- 5 La presente invención proporciona nuevos métodos para mejorar la actividad efectora de anticuerpos. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, pueden proporcionarse productos farmacéuticos de anticuerpo que son más eficaces incluso a dosis bajas debido a una actividad efectora mejorada, independientemente de la actividad de unión anticuerpo-antígeno. Se espera que se puedan obtener anticuerpos farmacéuticos con un efecto terapéutico notable seleccionando anticuerpos con alta afinidad por antígenos que son específicos para las células objetivo, tales como células cancerosas, y modificando los anticuerpos por los métodos de la presente invención.
- 10 Además, los fármacos de anticuerpos existentes ya conocidos como terapéuticamente eficaces pueden modificarse para ser más efectivos.

Listado de Secuencias

- <110> TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE
- <120> Un anticuerpo modificado con actividad biológica mejorada
- 15 <130> T4-A0601P
- <150> JP 2006-057475
- <151> 2006-03-03
- <160> 63
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 702
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente
- <400> 1

atggatthtc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatccttt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt ttaagtttca tgcactggta ccagcagaag 180
 ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtccct 240
 gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag 300
 gctgaagatg ctgccactta tttctgccat cagtggagta gtaaccgct cacgttcggt 360
 gctgggacca agctgctcga gactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
 agagaggcta aagtacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

<210> 2

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 2

10 **Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser**
1 5 10 15

ES 2 602 439 T3

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Ser Ser Leu Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Trp
 100 105 110

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Leu Glu Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

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

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

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 3

<211> 1416

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

ES 2 602 439 T3

<400> 3

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag	60
gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct	180
ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat	240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgcactac	360
ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	420
tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	540
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag	720
cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat	1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac	1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc	1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga	1416

<210> 4

<211> 471

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 4

5	Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Phe	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
	1				5					10					15	

ES 2 602 439 T3

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

ES 2 602 439 T3

			260						265						270			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val			
		275					280					285						
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp			
	290					295					300							
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr			
305					310					315					320			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
				325					330					335				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu			
			340					345					350					
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg			
		355					360					365						
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys			
	370					375					380							
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp			
385					390					395					400			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys			
				405					410					415				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser			
			420					425					430					
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser			
		435					440					445						
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser			
	450					455					460							
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
465					470													

<210> 5

<211> 2115

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 5

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180
ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gtctgacatc tgaggactct ggggtctatt actgtgcaag atcgactac 360
ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacia gaaggttgag 720
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacia agccgcggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccc ccaaacttag tgacaaaact 1440
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttctcttc 1500
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg 1560
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1620
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1680
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacia gtgcaaggtc 1740
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaacctct ccaaagcaa agggcagccc 1800
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1860

agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc 1920
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1980
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 2040
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 2100
tctccgggta aatga 2115

<210> 6

<211> 704

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 6

ES 2 602 439 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
675 680 685

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
690 695 700

<210> 7

<211> 2130

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 7

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
 gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg ggcctcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180
 ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgactac 360
 ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
 tctaagotta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

ES 2 602 439 T3

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcggtgg ctcgcccaaa 1440
 tctagtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 1500
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 1560
 gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1620
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1680
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1740
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1800
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1860
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1920
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1980
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 2040
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 2100
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2130

<210> 8

<211> 709

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 8

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 610 615 620

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 625 630 635 640

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 645 650 655

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 660 665 670

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 675 680 685

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 690 695 700

Leu Ser Pro Gly Lys
 705

<210> 9

<211> 2145

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 9

ES 2 602 439 T3

atgggatgga	gctgtatcat	cttctttttg	gtagcaacag	ctacaggtgt	ccactcccag	60
gtgcaactgc	ggcagcctgg	ggctgagctg	gtgaagcctg	gggcctcagt	gaagatgtcc	120
tgcaaggctt	ctggctacac	atctaccagt	tacaatatgc	actgggtaaa	gcagacacct	180
ggacagggcc	tggaatggat	tggagctatt	tatccaggaa	atggtgatac	ttcctacaat	240
cagaagttca	aaggcaaggc	cacattgact	gcagacaaat	cctccagcac	agcctacatg	300
cagctcagca	gtctgacatc	tgaggactct	gcggtctatt	actgtgcaag	atcgactac	360
ggtagtaact	acgtagacta	ctttgactac	tggggccaag	gcaccactct	cacagtctcc	420
tctaagctta	ccaagggccc	atcggctctc	cccctggcac	cctcctccaa	gagcacctct	480
gggggcacag	cggccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacgggtg	540
tcgtggaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggctgt	cctacagtcc	600
tcaggactct	actccctcag	cagcgtggtg	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacccag	660
acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gaaggttgag	720
cccaaattctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	780

ES 2 602 439 T3

ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gcccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcgggtg ctccggcggt 1440
 ggtgggtcgc ccaaatctag tgacaaaact cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa 1500
 ctctggggg gaccgtcagt cttcctctc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1560
 tcccggacc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1620
 aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1680
 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1740
 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1800
 aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1860
 tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1920
 ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1980
 acgcctccc tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 2040
 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2100
 aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 2145

<210> 10

<211> 714

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 10

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

ES 2 602 439 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

ES 2 602 439 T3

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
530 535 540

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
545 550 555 560

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
565 570 575

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
580 585 590

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
595 600 605

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
610 615 620

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
625 630 635 640

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
645 650 655

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
660 665 670

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
675 680 685

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
690 695 700

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710

<210> 11

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 11

ES 2 602 439 T3

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60
gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggcct ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180

ES 2 602 439 T3

ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgcactac 360
 ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
 tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
 cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctctggca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcggtgg ctcgggcggt 1440
 ggtgggtcgg gtggcggcgg atctccaaa tctagtgaca aaactcacac atgcccaccg 1500
 tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 1560
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac 1620
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1740
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
 ccagccccc tcgagaaaac catctccaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
 tacaccctgc cccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggt agagcaatgg gcagccggag 1980
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 2040
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 2160

<210> 12

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 12

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

ES 2 602 439 T3

	195		200		205														
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys				
	210					215					220								
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu				
225					230					235					240				
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro				
				245					250					255					
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys				
			260					265					270						
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val				
		275					280					285							
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp				
	290					295					300								
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr				
305					310					315					320				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp				
				325					330					335					
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu				
			340					345					350						
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg				
		355					360					365							
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys				
	370					375					380								
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp				
385					390					395					400				
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys				
				405					410					415					
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser				
		420						425					430						
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser				
		435					440					445							

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 485 490 495

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 500 505 510

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 515 520 525

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 530 535 540

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 545 550 555 560

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 565 570 575

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 580 585 590

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 595 600 605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 610 615 620

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 625 630 635 640

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 675 680 685

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 13

<211> 2814

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 13

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
 gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180
 ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgactac 360
 ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
 tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 840
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat 1140
 gagctgacca agaaccaggc cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccc ccaaactag tgacaaaact 1440
 cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctctc 1500

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggacc ctgaggtcac atgctgtgtg 1560
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 1620
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 1680
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1740
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1800
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1860
 agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1920
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1980
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 2040
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 2100
 tctccgggta aatctagacc caaatctagt gacaaaactc acacatgcc accgtgcca 2160
 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttcctcttc ccccaaaacc caaggacacc 2220
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 2280
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 2340
 ccgcgggag agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 2400
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 2460
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 2520
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa 2580
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 2640
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaagctc 2700
 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 2760
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 2814

<210> 14

<211> 937

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 14

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
 465 470 475 480

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 485 490 495

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 500 505 510

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 515 520 525

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

530						535										540	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val		
545					550					555					560		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr		
				565					570					575			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr		
			580					585					590				
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu		
		595					600					605					
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys		
	610					615					620						
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
625					630					635					640		
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
				645					650					655			
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
			660					665					670				
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
		675					680					685					
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	690					695					700						
Ser	Arg	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro		
705					710					715				720			
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys		
				725					730					735			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val		
			740					745					750				
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr		
		755					760					765					
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu		
	770					775					780						

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 785 790 795 800

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 805 810 815

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 820 825 830

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 835 840 845

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 850 855 860

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 865 870 875 880

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 885 890 895

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 900 905 910

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 915 920 925

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 930 935

<210> 15

<211> 2844

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 15

ES 2 602 439 T3

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180
ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgcactac 360
ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420

ES 2 602 439 T3

tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
tcgtggaact caggegcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 720
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctccccgacc 840
cctgaggtca catgcgtggg ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccccggat 1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcgggtg ctcgcccaaa 1440
tctagtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 1500
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctccc gaccctgag 1560
gtcacatgcg tgggtgggga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 1620
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 1680
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1740
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1800
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatccc ggatgagctg 1860
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1920
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1980
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 2040
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggtc tgacacaacca ctacacgcag 2100
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatct agaggtggcg gtggctcgcc caaatctagt 2160
gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 2220
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2280
tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 2340

ES 2 602 439 T3

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 2400
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 2460
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 2520
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 2580
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 2640
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 2700
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 2760
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 2820
ctctccctgt ctccgggtaa atga 2844

<210> 16

<211> 947

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 16

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

ES 2 602 439 T3

130						135										140
Lys 145	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 150	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser 155	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser 160	
Gly	Gly	Thr	Ala	Ala 165	Leu	Gly	Cys	Leu	Val 170	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro 175	Glu	
Pro	Val	Thr	Val 180	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly 185	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly 190	Val	His	
Thr	Phe	Pro 195	Ala	Val	Leu	Gln	Ser 200	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser 205	Leu	Ser	Ser	
Val	Val 210	Thr	Val	Pro	Ser	Ser 215	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln 220	Thr	Tyr	Ile	Cys	
Asn 225	Val	Asn	His	Lys	Pro 230	Ser	Asn	Thr	Lys	Val 235	Asp	Lys	Lys	Val	Glu 240	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp 245	Lys	Thr	His	Thr	Cys 250	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala 255	Pro	
Glu	Leu	Leu	Gly 260	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 265	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 270	Pro	Lys	
Asp	Thr 275	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr 280	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 285	Val	Val	Val	
Asp 290	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro 295	Glu	Val	Lys	Phe	Asn 300	Trp	Tyr	Val	Asp	
Gly 305	Val	Glu	Val	His	Asn 310	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro 315	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr 320	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg 325	Val	Val	Ser	Val	Leu 330	Thr	Val	Leu	His	Gln 335	Asp	
Trp	Leu	Asn	Gly 340	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys 345	Lys	Val	Ser	Asn	Lys 350	Ala	Leu	
Pro	Ala 355	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 360	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly 365	Gln	Pro	Arg	
Glu 370	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu 375	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp 380	Glu	Leu	Thr	Lys	

ES 2 602 439 T3

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys
 465 470 475 480

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 485 490 495

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 500 505 510

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 515 520 525

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 530 535 540

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 545 550 555 560

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 565 570 575

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 580 585 590

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 595 600 605

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 610 615 620

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 625 630 635 640

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 645 650 655
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 660 665 670
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 675 680 685
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 690 695 700
 Leu Ser Pro Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ser
 705 710 715 720
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 725 730 735
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 740 745 750
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 755 760 765
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 770 775 780
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 785 790 795 800
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 805 810 815
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 820 825 830
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 835 840 845
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 850 855 860
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 865 870 875 880
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 885 890 895

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
900 905 910

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
915 920 925

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
930 935 940

Pro Gly Lys
945

<210> 17

<211> 2874

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 17

ES 2 602 439 T3

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag	60
gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct	180
ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat	240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg	300
cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgcactac	360
ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	420
tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	480
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	540
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	600
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	660
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag	720
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	780
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac	960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1080

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atccccggat 1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcggtgg ctcgggcggt 1440
ggtgggtcgc ccaaacttag tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 1500
ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 1560
tcccggacce ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 1620
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1680
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1740
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 1800
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1860
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 1920
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1980
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 2040
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 2100
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatctagagg tggcggtggc 2160
tcgggcgggtg gtgggtcgc caaatctagt gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc 2220
gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc 2280
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 2340
cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 2400
ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 2460
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc 2520
cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 2580
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggcca gcctgacctg cctggtcaaa 2640
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 2700
tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc 2760
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 2820
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atga 2874

<211> 957

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 485 490 495

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 500 505 510

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 515 520 525

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 530 535 540

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 545 550 555 560

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 565 570 575

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 580 585 590

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 595 600 605

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 610 615 620

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 625 630 635 640

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 645 650 655

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 660 665 670

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 675 680 685

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 690 695 700

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly
 705 710 715 720

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys

<220>

<223> Una secuencia de nucleótido sintetizada artificialmente

<400> 19

atgggatgga gctgtatcat cttctttttg gtagcaacag ctacaggtgt cactcccag 60
 gtgcaactgc ggcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg ggcctcagt gaagatgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct 180
 ggacagggcc tggaatggat tggagctatt tatccaggaa atggtgatac ttcctacaat 240
 cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gtctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atcgactac 360
 ggtagtaact acgtagacta ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 420
 tctaagctta ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 720
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 840
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 960
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
 aaggagtaca agtgcaaggc ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggatccg gtggcggtgg ctcgggcggt 1440
 ggtgggtcgg gtggcgggcg atctcccaa tctagtgaca aaactcacac atgccaccg 1500
 tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 1560
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 1620
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacogtc 1740

ES 2 602 439 T3

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
ccagccccc tgcagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 2040
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatct 2160
agaggtggcg gtggctcggg cgggtggtggg tccgggtggcg gcggatctcc caaatctagt 2220
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc a gcacctgaac tccctgggggg accgtcagtc 2280
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 2340
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 2400
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 2460
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 2520
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 2580
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 2640
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 2700
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 2760
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 2820
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 2880
ctctccctgt ctccgggtaa atga 2904

<210> 20

<211> 967

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<400> 20

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Arg Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

ES 2 602 439 T3

Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser His Tyr Gly Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Lys Leu Thr
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 485 490 495
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 500 505 510
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 515 520 525
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 530 535 540
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 545 550 555 560

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 565 570 575

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 580 585 590

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 595 600 605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 610 615 620

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 625 630 635 640

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 675 680 685

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
 705 710 715 720

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 725 730 735

Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 740 745 750

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 755 760 765

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 770 775 780

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 785 790 795 800

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

					805					810						815
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
			820					825					830			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
		835					840					845				
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
	850					855					860					
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	
865					870					875					880	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				885					890					895		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			900					905					910			
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
		915					920					925				
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
	930					935					940					
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
945					950					955					960	
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				965												

<210> 21

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 21

cgagctcgag cggccgcttt tttttttt tttt 35

<210> 22

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 22

tcgtctaggc tagcattgt ctctcccagt ctcca 35

10 <210> 23

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 23

gcttgagact cgagcagctt ggtcccagca ccgaa 35

<210> 24

<211> 111

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 24

gagtttgcta gcgccgccat ggattttcaa gtgcagattt tcagcttcct gctaatcagt 60

25 **gcttcagtca taatgtccag aggacaaatt gttctctccc agtctccagc a 111**

<210> 25

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 25
 gcttgagact cgagcagctt ggtcccagca ccgaa 35
 <210> 26
 5 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 10 <400> 26
 acctctaact cgagactgtg gctgcacat ctgt 34
 <210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 27
 actgaattc ctaacactct cccctgttga 30
 20 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente
 <400> 28
 gtcgacgcta gcaaggatcc ttgaattcct taagg 35
 <210> 29
 <211> 35
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente		
	<400> 29		
	gtcgacctta aggaattcaa ggatccttgc tagcg	35	
5	<210> 30		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
10	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 30		
	cacgctcga cgccgcatg gcccaggtgc aactg	35	
	<210> 31		
	<211> 35		
15	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 31		
20	gcgccaagc ttagaggaga ctgtgagagt ggtgc	35	
	<210> 32		
	<211> 98		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 32		
	cacgctcga cgccgcatg ggatggagct gtatcatctt ctttttggtg gcaacagcta	60	
	caggtgtcca ctcccaggtg caactgcggc agcctggg	98	
	<210> 33		
30	<211> 35		

- <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- 5 <400> 33
gcgccaagc ttagaggaga ctgtgagagt ggtgc 35
<210> 34
<211> 35
<212> ADN
- 10 <213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 34
tctcctcaaa gcttaccaag ggcccatcgg tottc 35
- 15 <210> 35
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 20 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 35
ctgcccgcg cgcccgtca ttaccggga gacag 35
<210> 36
<211> 30
- 25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 36
- 30 gtcgggatcc cccaaatcta gtgacaaaac 30
<210> 37

- <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
- 5 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 37
 gtcgggatcc ggtggcgggtg gctcgcccaa atctagtgac aaaac 45
 <210> 38
 <211> 60
- 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 38
- 15 gtcgggatcc ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtgggtcg cccaaatcta gtgacaaaac 60
 <210> 39
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
 <400> 39
gtcgggatcc ggtggcgggtg gctcgggcgg tggtgggtcg ggtggcggcg gatctcccaa 60
atctagtgac aaaac 75
 <210> 40
- 25 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- 30 <400> 40

	gtcgggatcc ttaccgga gacaggaga g	31	
	<210> 41		
	<211> 32		
	<212> ADN		
5	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 41		
	tcctagtcta gaccctaatc tagtgacaaa ac	32	
10	<210> 42		
	<211> 47		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
15	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 42		
	tcctagtcta gaggtggcgg tggctcgccc aatctagtg acaaac	47	
	<210> 43		
	<211> 62		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente		
	<400> 43		
	tcctagtcta gaggtggcgg tggctcgccc ggtggtgggt cgccctaatc tagtgacaaa	60	
25	ac		62
	<210> 44		
	<211> 77		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		

	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
	<400> 44	
	tcctagtcta gaggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt cgggtggcgg cggatctccc	60
	aaatctagtg acaaaac	77
	<210> 45	
5	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente	
10	<400> 45	
	tcctagtcta gattaccgg gagacagga gag	33
	<210> 46	
	<211> 35	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente	
	<400> 46	
	gtcgcgcta gcaaggatcc ttgaattcct taagg	35
20	<210> 47	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Una secuencia de oligonucleótido sintetizada artificialmente	
	<400> 47	
	gtcgacctta aggaattcaa ggatcctgc tagcg	35
	<210> 48	
	<211> 5	
30	<212> PRT	

- <210> 52
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial
- 5 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 52
attaatcagc ggccgctcac ggggatccaa cagat 35
<210> 53
- 10 <211> 35
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- 15 <400> 53
ccccaagct gccgcatgt ggttcttgac aactc 35
<210> 54
<211> 35
<212> ADN
- 20 <213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 54
aacaaaagct tgccgcatg gagaccctct 35
- 25 <210> 55
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
- 30 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 55

- ccccaagctt gccgcatgg gaatcctgtc attct 35
- <210> 56
- <211> 31
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 56
- atatgaattc gccgcatgt ggcagctgct c 31
- 10 <210> 57
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 15 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 57
- gcgaatctag aatgaaacca gacaggag 28
- <210> 58
- <211> 29
- 20 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
- <400> 58
- 25 acgattctag acattggtga agagctgcc 29
- <210> 59
- <211> 29
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 30 <220>
- <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 59
acgattctag acatcgggtga agagctggg 29
<210> 60
<211> 30
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 60
10 cggcatctag attggtacc agtggaag 30
<210> 61
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
<400> 61
tctgcagggg gcttttggg agtaaaaat 29
<210> 62
20 <211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
25 <400> 62
attttactc caaaaagcc ccctgcaga 29
<210> 63
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Artificial
<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificialmente

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (2) .. (6)

5 <223> Repetición arbitraria

<400> 63

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mejorar una actividad efectora de un anticuerpo, en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están enlazadas en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo por una técnica de ingeniería genética, en donde la actividad efectora es actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), siempre y cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana esté enlazada en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de amino ácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de la IgG1 humana.
- 10 2. Un método para producir un anticuerpo modificado con actividad efectora mejorada, en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están enlazadas en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo por una Técnica de ingeniería genética, en donde la actividad efectora es actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), con la condición de que cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana esté enlazada en tándem al extremo del terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana.
- 15 3. Un método para producir un anticuerpo modificado con actividad efectora mejorada, en donde la actividad efectora es actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), que comprende las tapas de:
- 20 (a) expresar un polinucleótido que codifica una cadena ligera y un polinucleótido que codifica una cadena pesada alterada en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están enlazadas en tándem al extremo del terminal C de una cadena pesada de anticuerpo,
- 25 siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está enlazada en tándem al extremo terminal C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste en cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana; y
- (b) recoger los productos de expresión de los polinucleótidos.
- 30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las estructuras comprenden un polipéptido espaciador en el lado N-terminal del dominio Fc de la IgG1 humana.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el número de estructuras es dos.
6. El método de la reivindicación 4 ó 5, en donde el polipéptido espaciador de acuerdo con la reivindicación 4 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 48, 49 y 50.
- 35 7. Un anticuerpo modificado, en donde una o más estructuras que comprenden un dominio Fc de IgG1 humana están enlazadas en tándem al extremo terminal C de una cadena pesada de anticuerpo, siempre y cuando, cuando una estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana está enlazada en tándem al extremo C de dicha cadena pesada de anticuerpo, dicha estructura que comprende un dominio Fc de IgG1 humana comprende un espaciador flexible de glicina/serina de 15 residuos de aminoácidos, en donde la unidad básica consiste de cuatro glicinas y una serina, cinco aminoácidos en total, en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana.
- 40 8. El anticuerpo modificado de la reivindicación 7, en donde las estructuras comprenden un polipéptido espaciador en el lado N-terminal del dominio Fc de IgG1 humana.
9. El anticuerpo modificado de la reivindicación 7 u 8, en donde el número de estructuras es dos.
- 45 10. El anticuerpo modificado de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el polipéptido espaciador de acuerdo con la reivindicación 8 se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 48, 49 y 50.
11. El anticuerpo modificado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para uso en medicina
12. El anticuerpo modificado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para uso en un método para tratar cáncer.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el anticuerpo modificado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde dicho espaciador de 15 residuos de aminoácidos es GGGGSGGGGSGGGGS.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el antígeno CD20 de diferenciación específico de células B.
- 5 15. El anticuerpo modificado de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que es un anticuerpo contra el antígeno CD20 de diferenciación específico de células B.

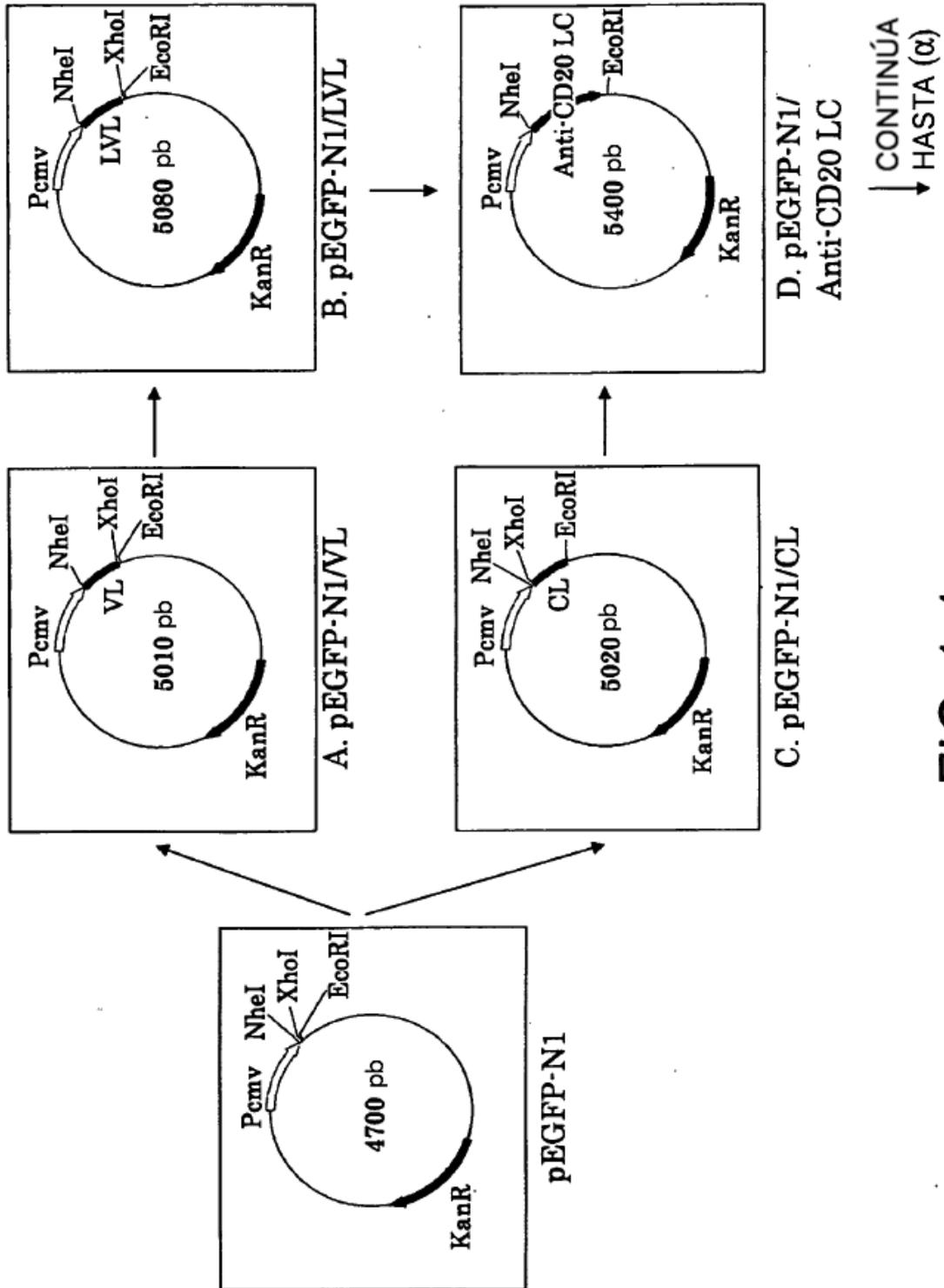


FIG. 1-1

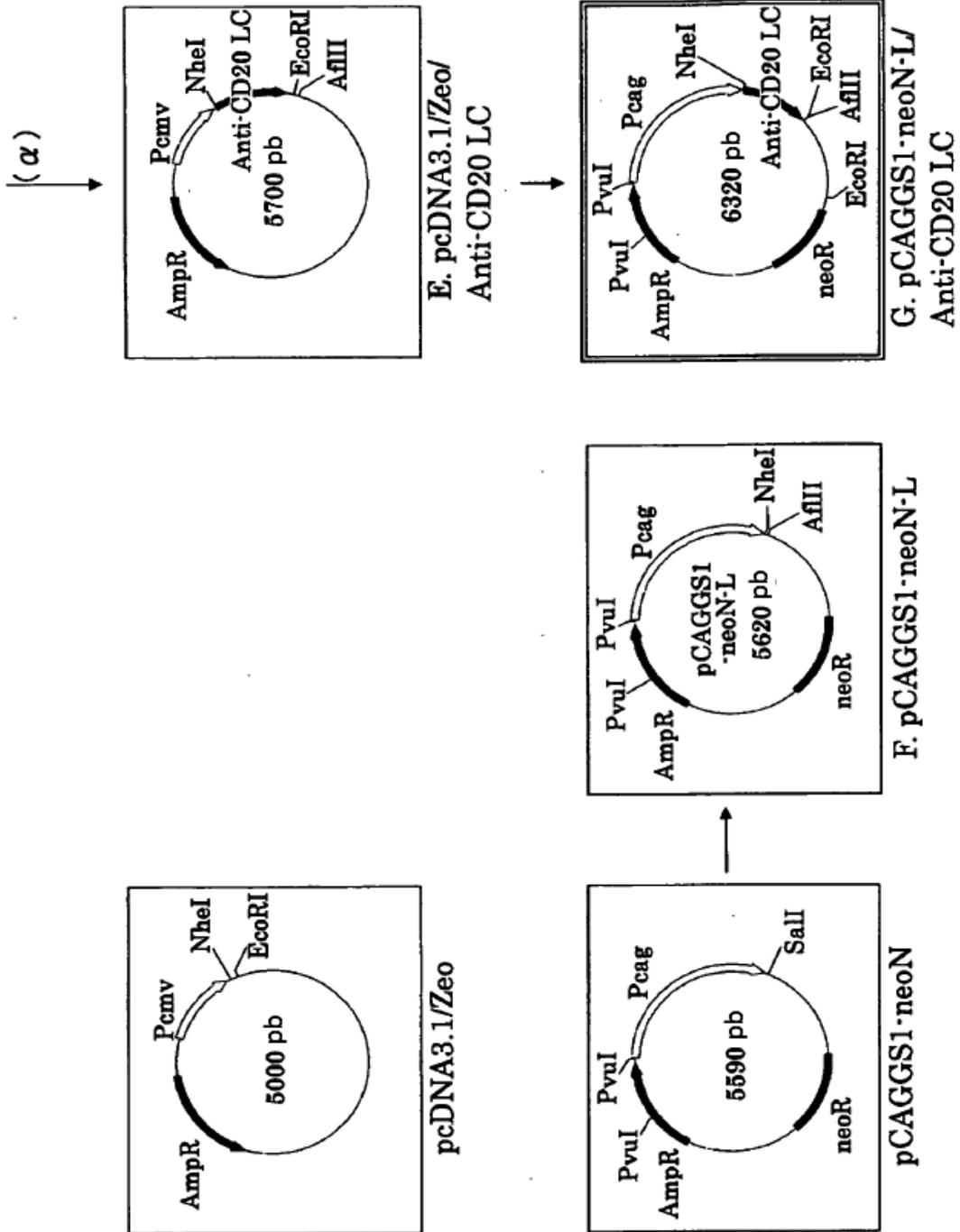


FIG. 1-2

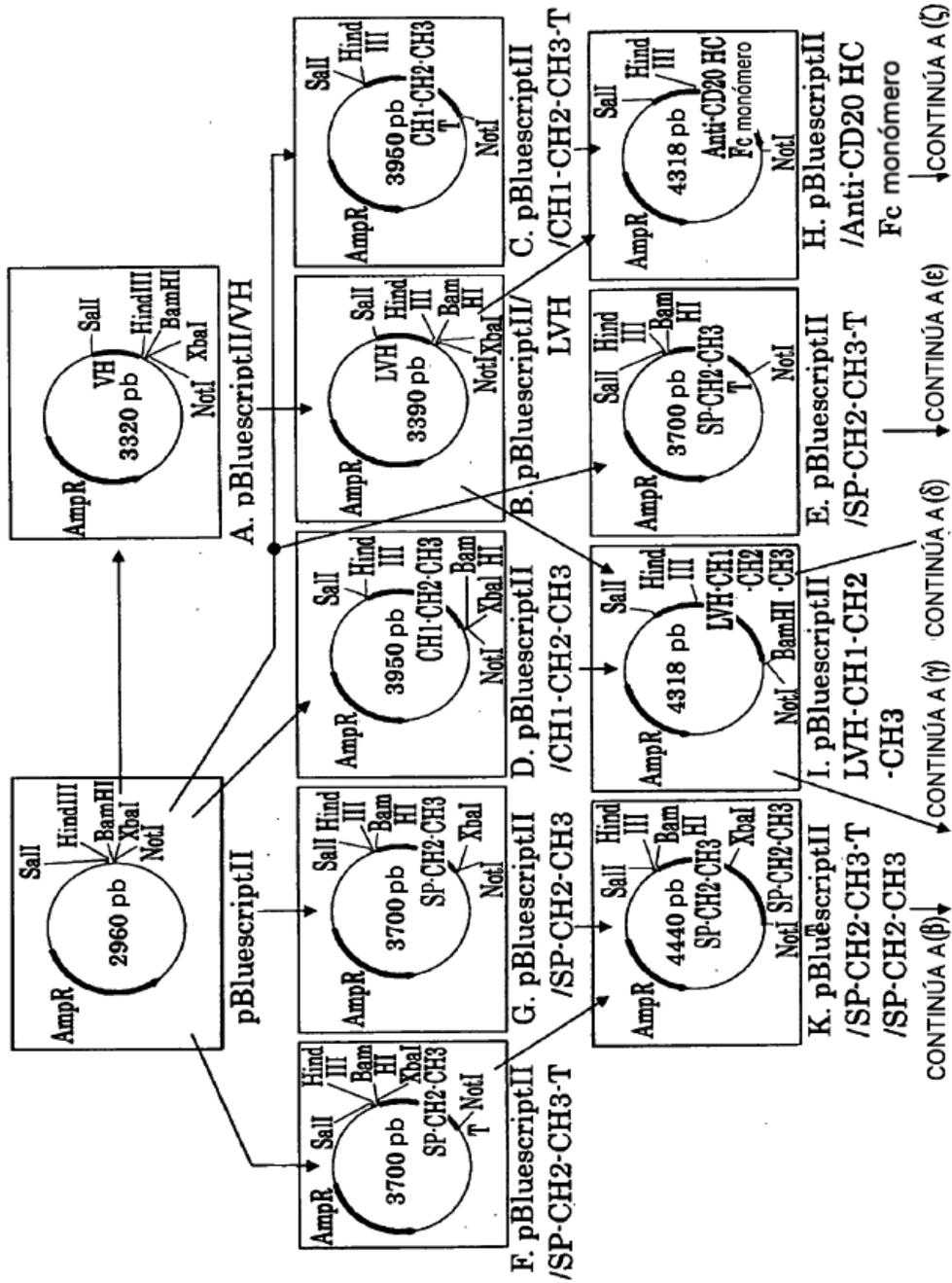


FIG. 2-1

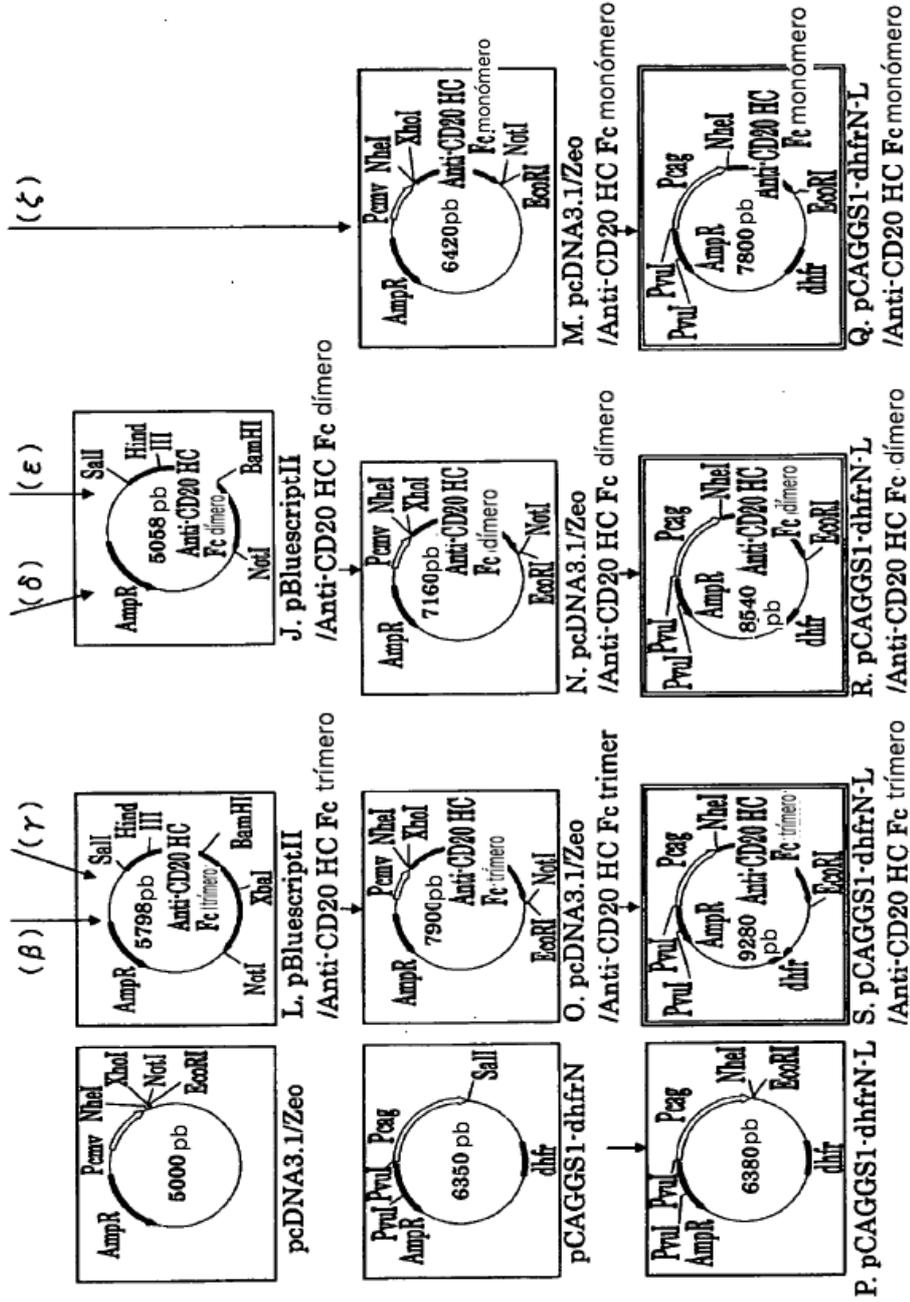


FIG. 2-2

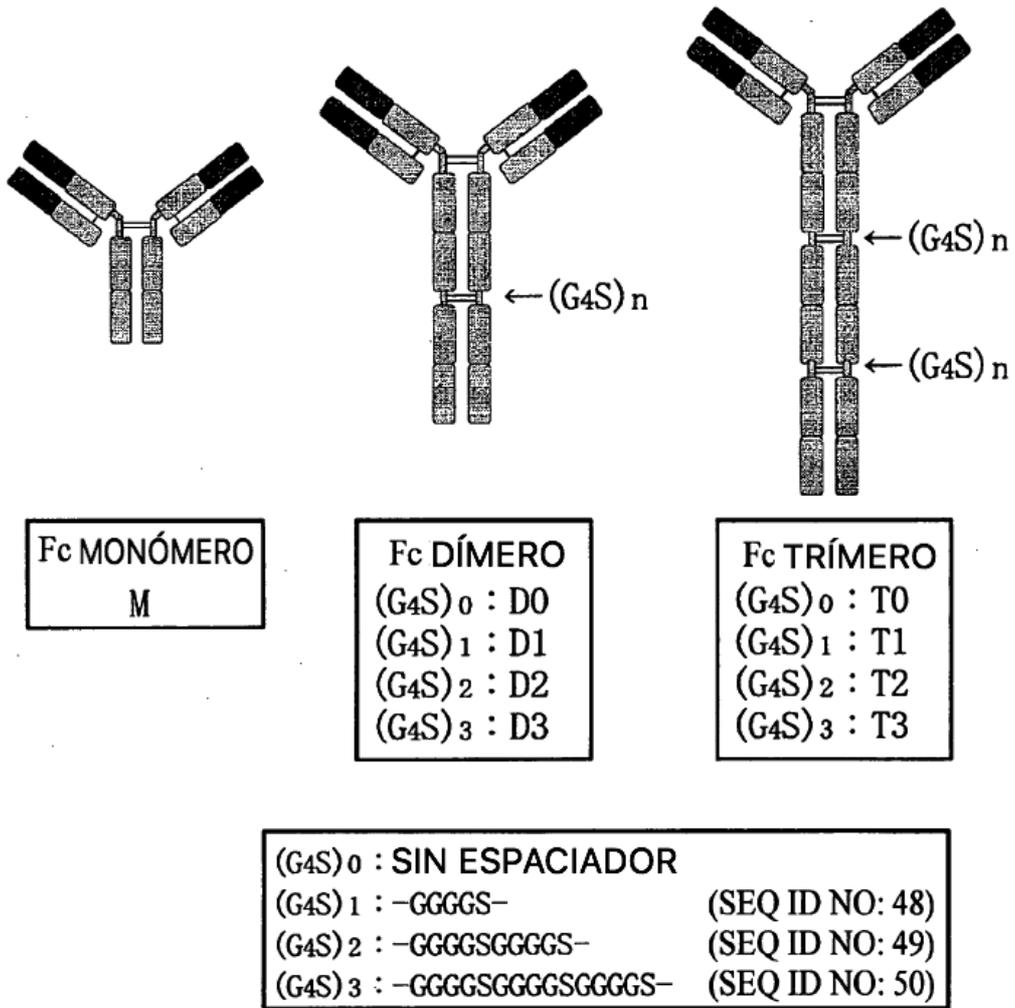


FIG. 4

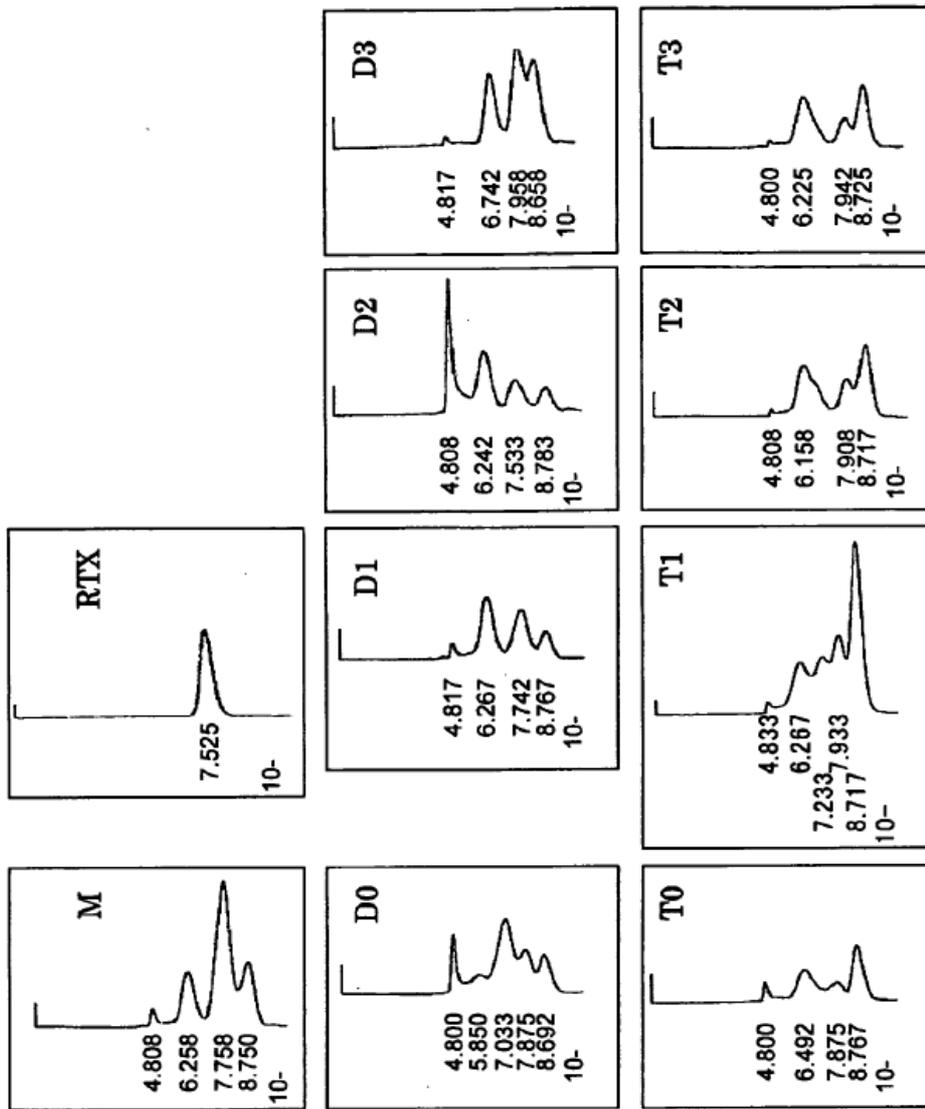


FIG. 5

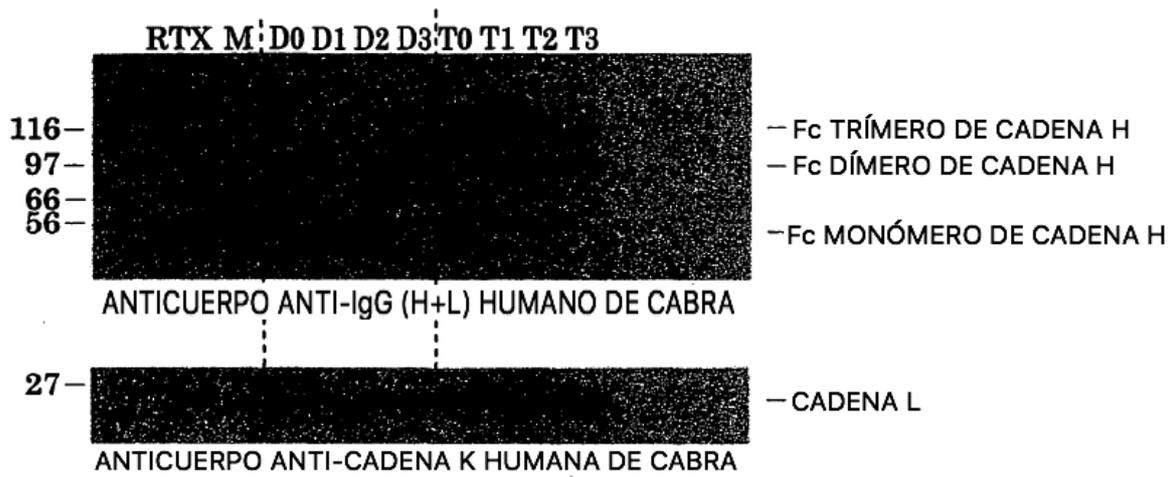


FIG. 6

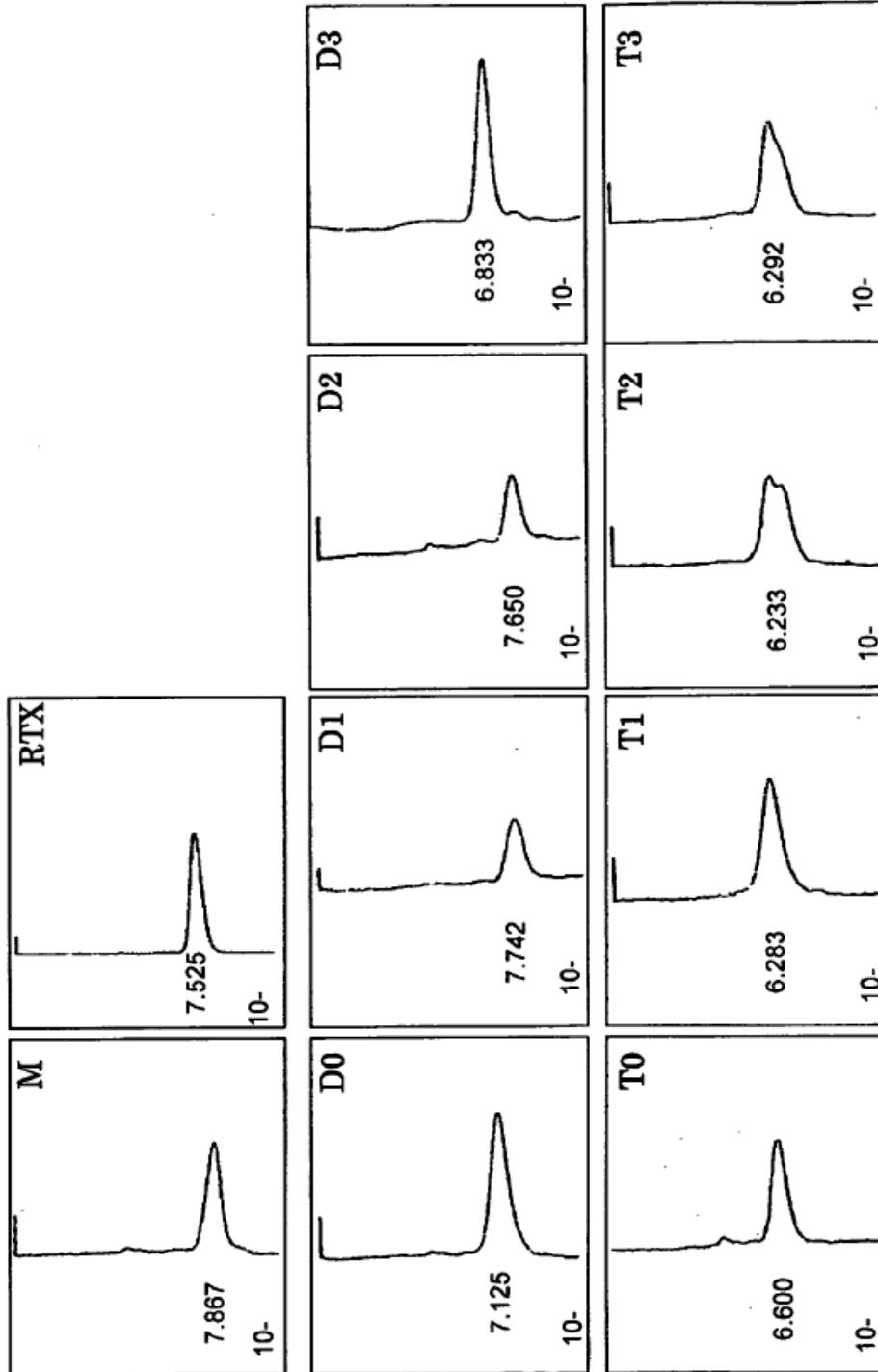


FIG. 7

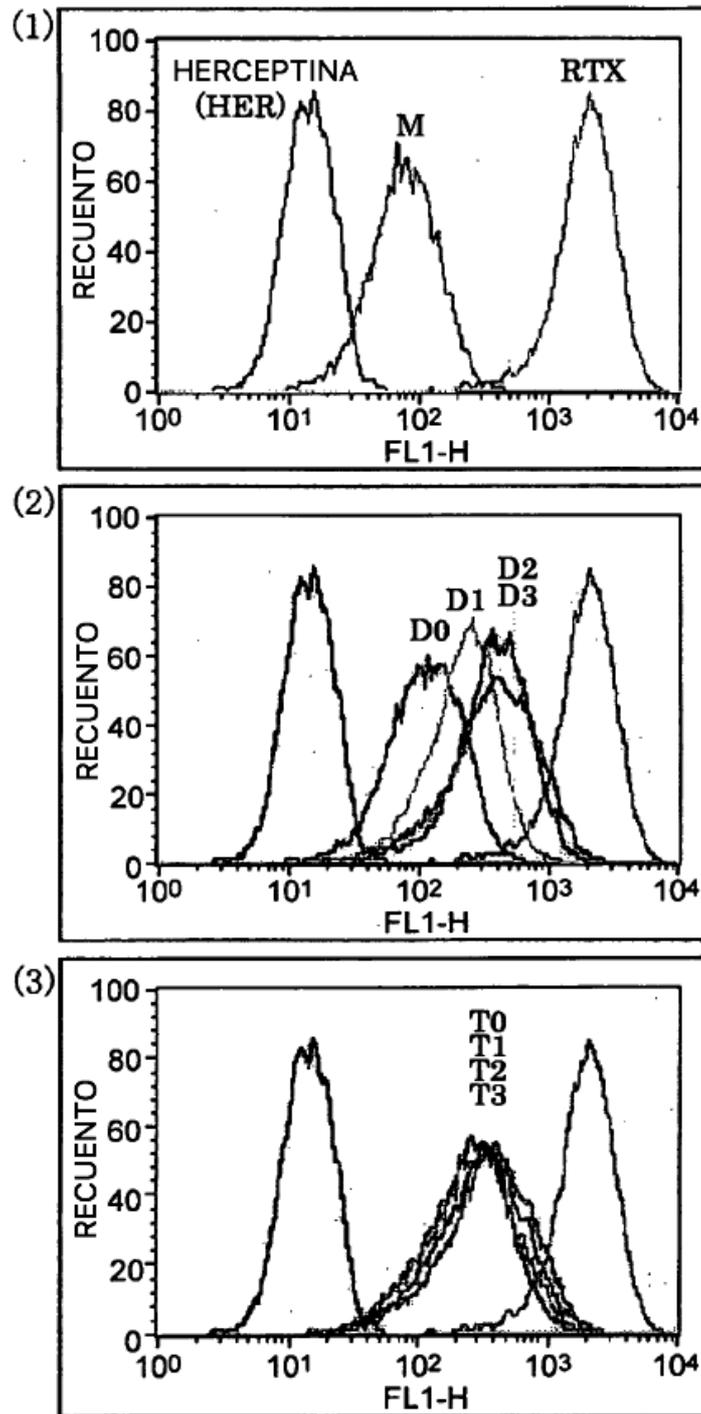


FIG. 8

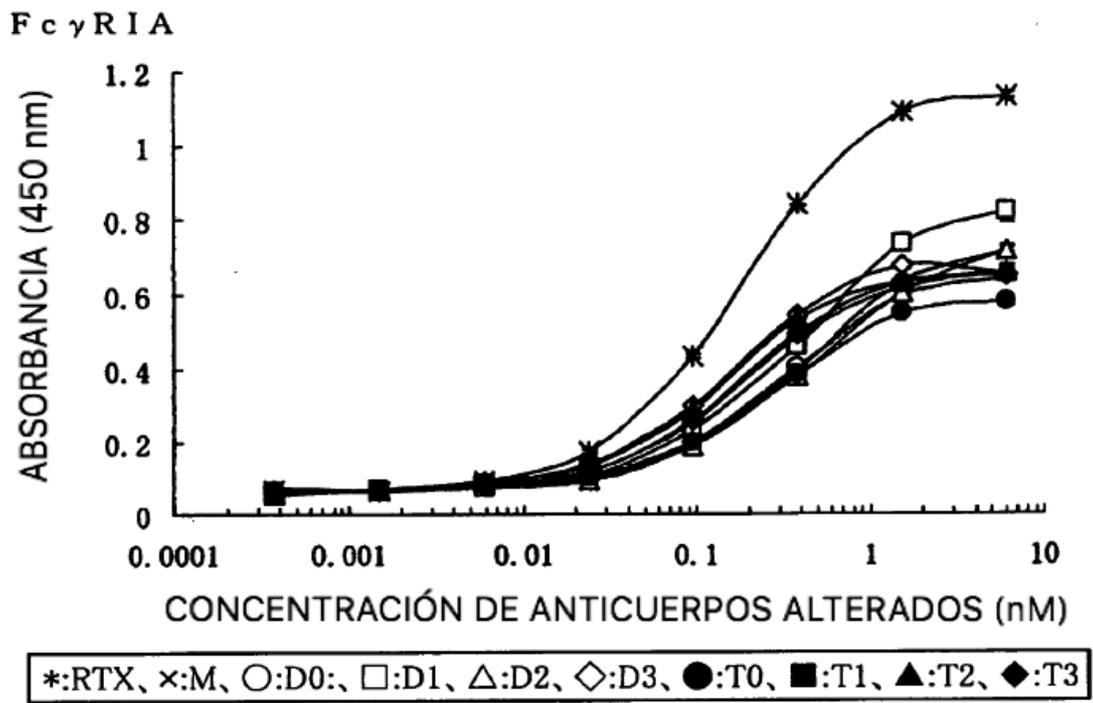


FIG. 9-1

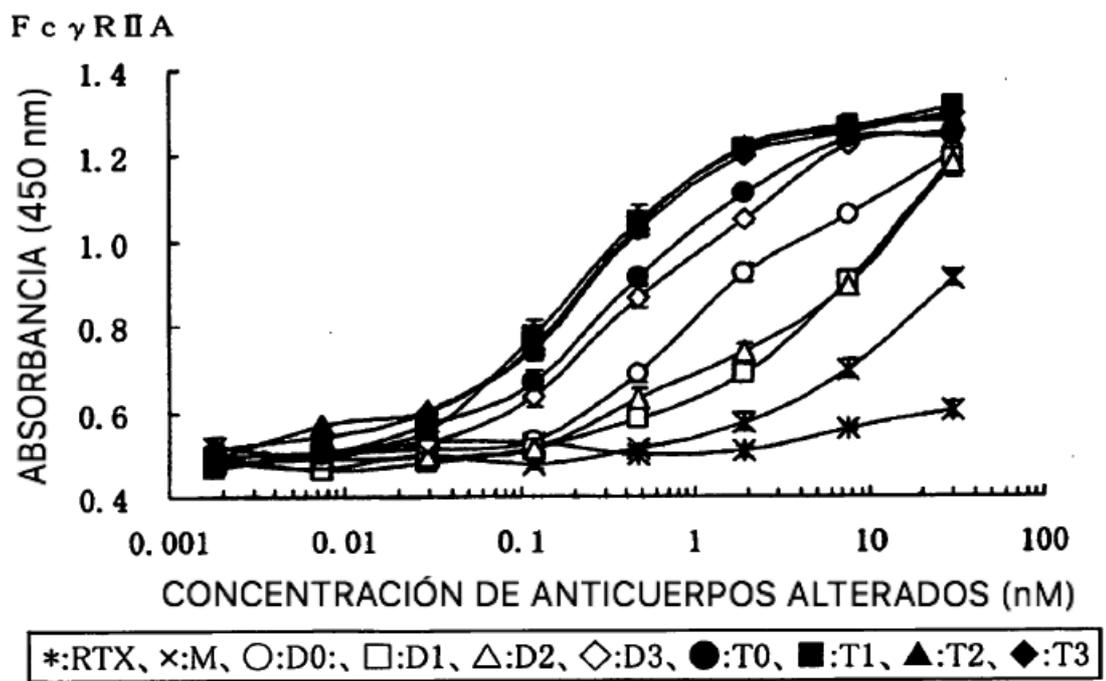


FIG. 9-2

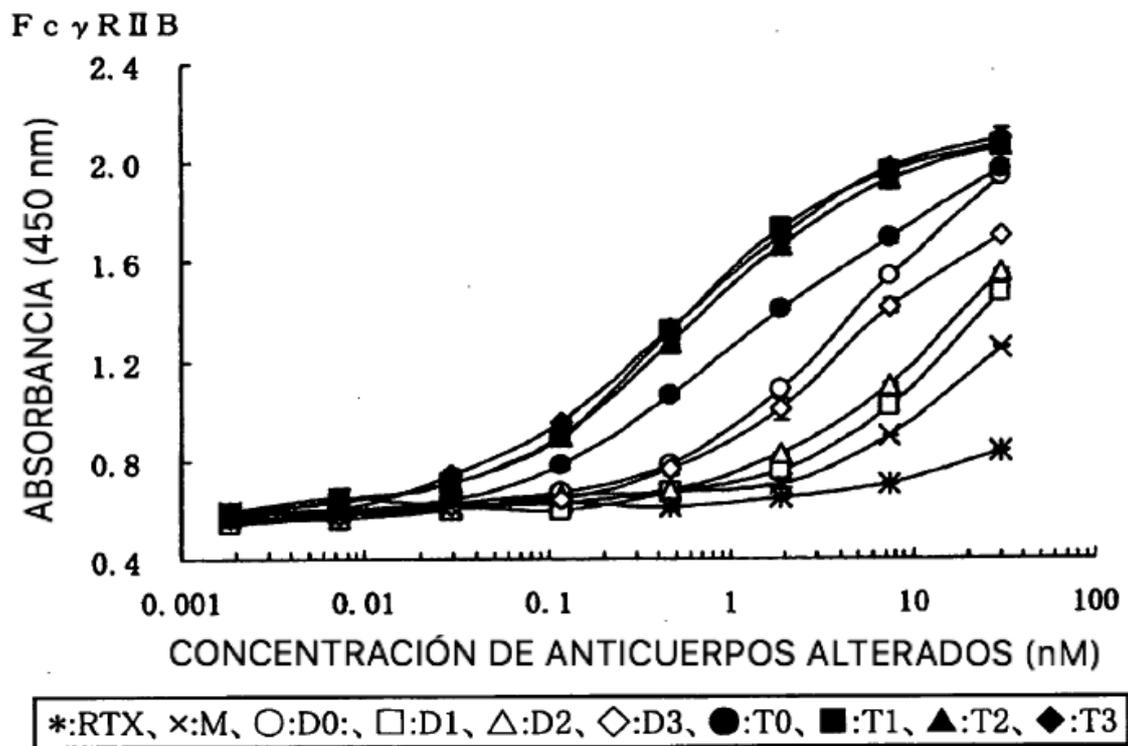


FIG. 9-3

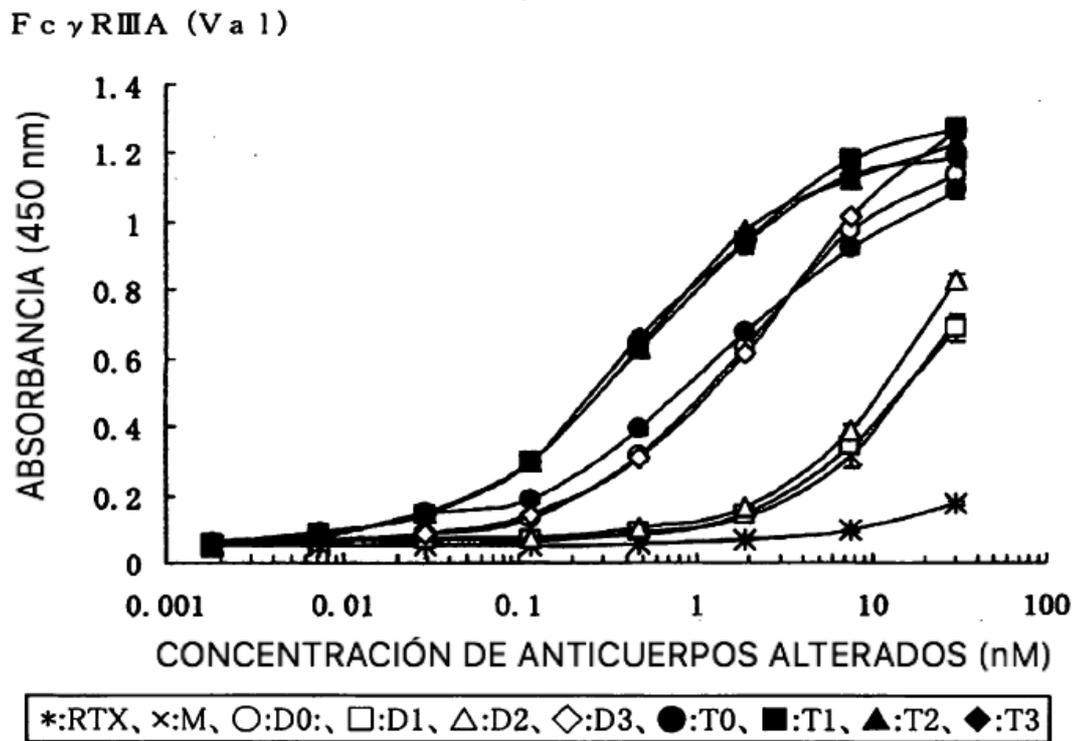


FIG. 9-4

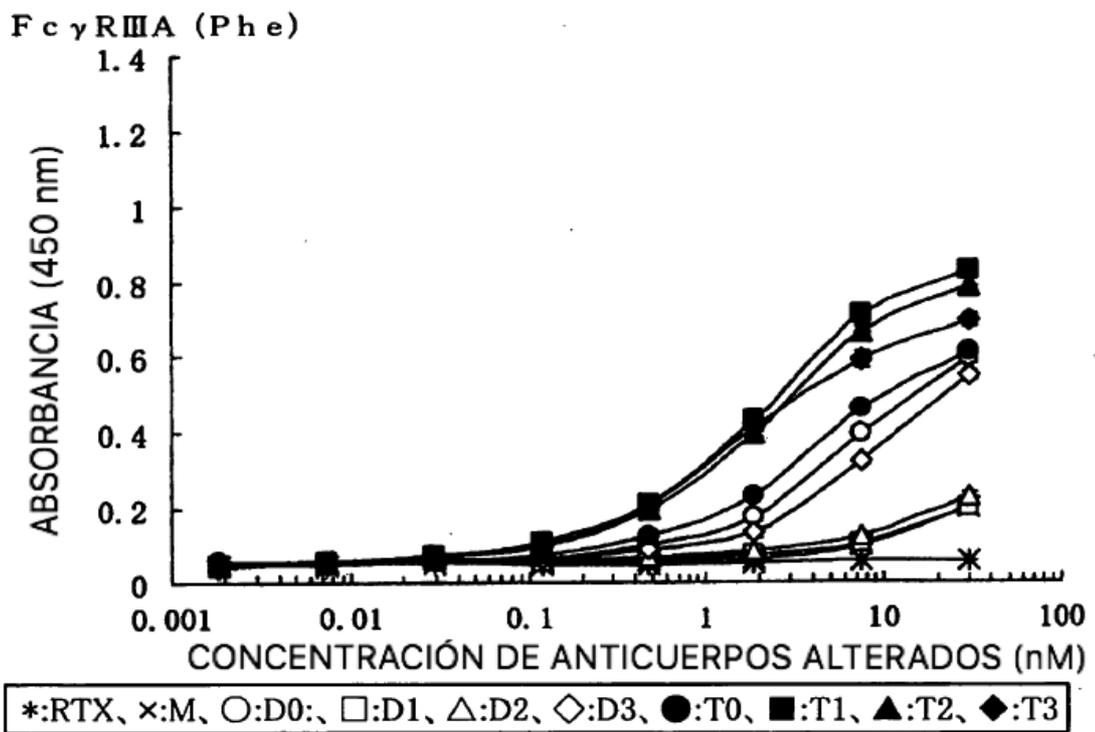


FIG. 9-5

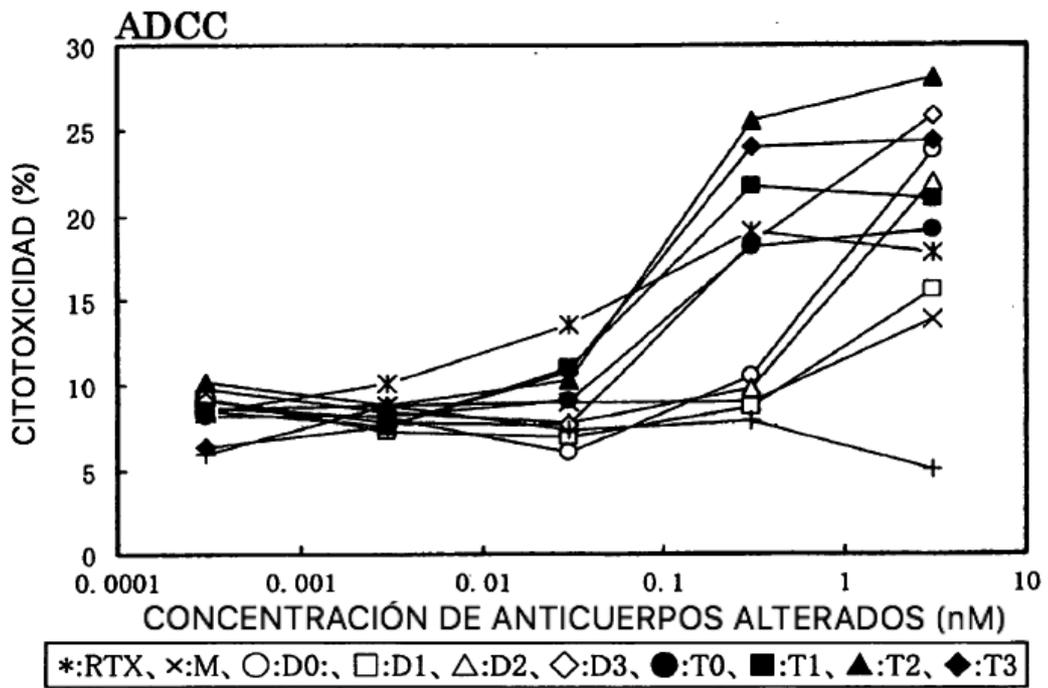


FIG. 10

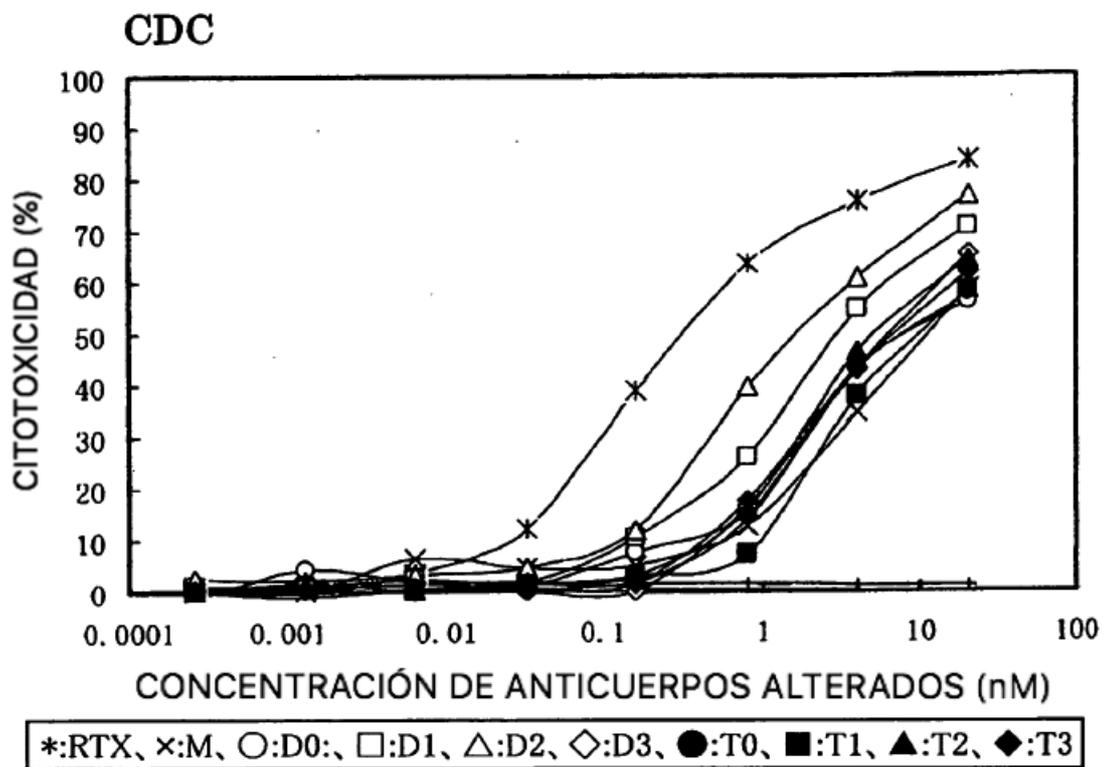


FIG. 11