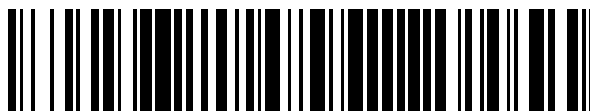


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 847**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009** **E 13180006 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018** **EP 2698165**

54 Título: **Inmunoglobulina citotóxica**

30 Prioridad:

02.05.2008 EP 08450068

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

28.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 683 847 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inmunoglobulina citotóxica

- 5 La invención se refiere a una inmunoglobulina citotóxica.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se han propuesto otros fragmentos de Inmunoglobulina para terapia humana.

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

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

El documento WO01/01748A2 describe compuestos peptídicos que se unen al producto génico erbB2 con afinidades de unión bajas. Una proteína de fusión péptido de ejemplo-Fc dirigida a erbB2 se analizó en ensayos de unión competitiva, en los que se usan como competidores una cantidad baja del mismo tipo de péptidos, lo que tiene como resultado un valor de CI50 bajo que, sin embargo, no sería indicativo de un valor de K_D o de CE50, como se determina en un ensayo de saturación.

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

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

Sumario de la invención

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

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

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

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

Un anticuerpo modular preferente de acuerdo con la invención es un oligómero de dominios del anticuerpo modular, en particular un oligómero de dominios de inmunoglobulina, o un fragmento de una inmunoglobulina de longitud completa. El anticuerpo modular citotóxico de acuerdo con la invención comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de una cadena pesada de IgG1.

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

En los anticuerpos desvelados en el presente documento, el sitio de unión diana en la superficie celular se localiza en la región CDR, y el sitio de unión con especificidad por un ligando funcional o un ligando estructural está dentro de la región bucle estructural.

De acuerdo con una realización preferente alternativa, el sitio de unión con especificidad por un ligando funcional o un ligando estructural está dentro de la región bucle CDR y el sitio de unión de la diana en la superficie celular localizado en una región bucle estructural.

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

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

Aunque había una prolongada necesidad de anticuerpos altamente eficaces pero de pequeño tamaño, por

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

Desvelado en el presente documento, se proporciona adicionalmente un método de producir un anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figuras:

Figura 1:

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

Figura 2:

Secuencia de aminoácidos y estructura secundaria de un dominio CH3 (IMGT, numeración). El esquema de aleatorización se proporciona para las bibliotecas Fcab01 a Fcab06.

Las posiciones aleatorizadas en el bucle AB y EF están marcadas con un círculo. X representa los 20 aminoácidos, z es solo Ala Asp, Ser, Tyr.

Figura 3:

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

Figura 4:

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

Figura 5:

secuencia de aminoácidos de FcabRGD4L (secuencia de aminoácidos)

Figura 6:

vector pHENFcabRGD4 (secuencia de nucleótidos)

Figura 7:

vector pHENFcabRGD4L (secuencia de nucleótidos)

Figura 8 (SEC ID N° 15):

vector pHENFcabRGD4L (secuencia de nucleótidos)

Figura 9 (SEC ID N° 16):

vector pYD1dXFc (secuencia de nucleótidos)

Figura 10 (SEC ID N° 17):

pYD1CH12 (secuencia de nucleótidos)

Figura 11 (SEC ID N° 18):

Fcab01 (secuencia de nucleótidos)

Figura 12 (SEC ID N° 19):

Fcab02 (secuencia de nucleótidos)

Figura 13 (SEC ID N° 20):

Fcab03 (secuencia de nucleótidos)

Figura 14 (SEC ID N° 21):

Fcab04 (secuencia de nucleótidos)

Figura 15 (SEC ID N° 22):

Fcab05 (secuencia de nucleótidos)

Figura 16 (SEC ID N° 23):

Fcab06 (secuencia de nucleótidos)

Figura 17 (SEC ID N° 72):

vector pYD1 (secuencia de nucleótidos)

Figura 18 (SEC ID N° 73):

vector pYD1Nhe modificado (secuencia de nucleótidos)

Figura 19 (SEC ID N° 74):

vector pYD1lnk (secuencia de nucleótidos)

Figura 20 (SEC ID N° 75):

vector pYD1mata (secuencia de nucleótidos)

Figura 21 (SEC ID N° 76):

vector pYD1gal (secuencia de nucleótidos)

Figura 22 (SEC ID N° 77):

4D5H (secuencia de nucleótidos)

Figura 23 (SEC ID N° 78):

4D5L (secuencia de nucleótidos)

Figura 24 (SEC ID N° 79):

vector pYD4D5hc (secuencia de nucleótidos)

Figura 25 (SEC ID N° 80):

4D5hp (secuencia de aminoácidos)

Figura 26 (SEC ID N° 81):

vector pYD4D5hl (secuencia de nucleótidos)

Figura 27 (SEC ID N° 82):

4D5lp (secuencia de aminoácidos)

Figura 28 (SEC ID N° 427):

plásmido pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt (secuencia de nucleótidos)

Descripción detallada de la invención

Definiciones

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

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

como CH1, CH2, CH3, CH4, CI y Ck, así como minidominios que consisten en al menos dos hebras beta de un dominios de inmunoglobulina conectado por un bucle estructural.

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

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

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

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

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

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

Los filómeros son péptidos derivados de fragmentos proteicos naturales biodiversos.

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

Un "bucle estructural" o un "bucle no CDR", como se usa de acuerdo con la presente invención, debe entenderse del siguiente modo: anticuerpos modulares, inmunoglobulinas o sustancias similares a inmunoglobulinas están formadas por dominios con un denominado pliegue de inmunoglobulina. En esencia, las láminas beta antiparalelas están conectadas por bucles para formar un barril beta antiparalelo comprimido. En la región variable, algunos de los bucles de los dominios contribuyen esencialmente a la especificidad del anticuerpo, es decir, la unión a un antígeno mediante el sitio de unión natural de un anticuerpo. Estos bucles se denominan bucles CDR. Los bucles CDR se localizan dentro de la región bucle CDR, que pueden, en algunos casos, también incluir parte de la región marco variable (denominada "VFR"), que es adyacente a los bucles CDR. Se sabe que algunos bucles del VFR pueden

contribuir a la cavidad de la unión a antígeno de un anticuerpo, que por lo general está determinada principalmente por los bucles CDR. Por tanto, dichos bucles VFR se consideran parte de la región bucle CDR, y no se usarían adecuadamente para modificar los nuevos sitios de unión a antígeno. Los bucles al lado de la cavidad de unión a antígeno o región bucle CDR, denominados bucles estructurales o bucles no CDR. Al contrario que el VFR dentro de la región bucle CDR, o localizado proximal a los bucles CDR, otros bucles del VFR de los dominios variables se considerarían bucles estructurales y particularmente adecuados para su uso de acuerdo con la invención. Estos son, preferentemente, bucles estructurales. del VFR localizado en oposición a la región bucle CDR, o en el lado C-terminal de un dominio de inmunoglobulina variable. Los dominios constantes tienen bucles estructurales. dentro de una región bucle estructural, por ejemplo, en el lado en C-terminal de un dominio de anticuerpo o en el lado N-terminal, incluso dentro de una cadena lateral de un dominio de anticuerpo. Los dominios constantes también se denominan parte de la región marco.

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

El término "diana" o "antígeno" como se usa de acuerdo con la presente invención comprenderá, en particular, moléculas seleccionadas del grupo que consiste en alérgenos, antígenos asociados con tumores, autoantígenos que incluyen receptores de la superficie c celular, enzimas, receptores Fc, FcRn, HSA, IgG, interleucinas o citocinas, proteínas del sistema del complemento, proteínas transportadoras, moléculas séricas, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos, antígenos protozoarios y antígenos virales, también moléculas responsables de la encefalitis espongiforme transmisible (EET), tales como priones, infecciosos o no, y marcadores o moléculas relacionadas con afecciones inflamatorias, tales como factores proinflamatorios, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer, u otros haptenos.

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

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

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

preferentemente, al menos 1.000 veces.

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

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

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

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

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

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

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

La expresión "ligando efector", como se usa para el fin de la presente invención, significa un ligando que participa en las funciones efectoras, como una molécula efectora. Ejemplos de ligandos efectores son receptores Fc o moléculas similares a receptores Fc que interfieren en las inmunoglobulinas. Un receptor Fc es una proteína que se encuentra sobre la superficie de determinadas células, incluyendo las células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, y mastocitos, que contribuyen a las funciones protectoras del sistema inmunológico. Su nombre deriva de su

especificidad de unión para una parte de un anticuerpo conocido como la región Fc (fragmento cristizable). Los receptores Fc se unen a los anticuerpos que están unidos a las células infectadas o patógenos invasores. Su actividad estimula las células fagocíticas o citotóxicas para destruir microbios, o células infectadas por la fagocitosis celular mediada por anticuerpos (ADCP) o citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpos (ADCC). Existen varios tipos diferentes de receptores Fc., que se clasifican basándose en el tipo de anticuerpos que reconocen, por ejemplo, los que se unen a la clase más frecuente de anticuerpos, IgG, se denominan receptores Fc-gamma (FcγR), los que se unen a IgA se denominan receptores Fc-alfa (FcαR) y los que se unen a IgE se denominan receptores Fc-epsilon (FcεR). Equivalente a un ligando efector y, por tanto, incorporado en la definición es un ligando sustituto que reconoce el mismo sitio de unión o uno similar dentro del anticuerpo modular, tal como la proteína A.

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

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

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

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

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

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

Como alternativa, se prefiere el uso de abordajes combinatorios. Se puede usar cualquiera de los métodos de mutagénesis conocidos, entre ellos la mutagénesis por casete. Estos métodos se pueden usar para realizar modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas de la inmunoglobulina de la presente invención. En

algunos casos, las posiciones se eligen de forma aleatoria, por ejemplo, con cualquiera de los posibles aminoácidos o una selección de aminoácidos preferidos para aleatorizar las secuencias bucle, o se realizan cambios de aminoácidos usando normas simples. Por ejemplo, todos los residuos se pueden mutar, preferentemente, en aminoácidos específicos, tales como alanina, denominado escaneo de aminoácidos o de alanina. Dichos métodos se

5 pueden acoplar a abordajes de ingeniería más sofisticados que usan métodos de selección para detectar niveles mayores de diversidad de secuencia.

El anticuerpo modular citotóxico de acuerdo con la invención con un peso molecular inferior a 60 kDa o hasta 60 KDa tiene un tamaño pequeño en comparación con los anticuerpos de longitud completa. El tamaño preferido es de

10 hasta 55 kDa. Los dominios sencillos de anticuerpos modulares normalmente tienen un tamaño molecular de 10-15 kDa, por tanto, una molécula basada en, o que consiste en, 4 dominios de anticuerpos modulares tendrían un tamaño molecular de 40-60 kDa, dependiendo de la glicosilación o cualquier conjugación adicional de sustancias farmacológicamente activas, como toxinas o péptidos.

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

20 expresar en varios sistemas de expresión y penetración de tejidos.

El anticuerpo modular citotóxico de acuerdo con la invención comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de una cadena pesada de IgG1 humana.

Es viable proporcionar el anticuerpo modular preferente de la invención como un anticuerpo de dominio único. Sin embargo, los dominios de anticuerpo tienden a dimerizar tras la expresión, bien como homodímero, como un Fc, o un heterodímero, como un Fab. Por tanto, la estructura dimérica se considera ventajosa para proporcionar una molécula estable. Los dímeros preferidos de los dominios de inmunoglobulinas se seleccionan del grupo que consiste en dímeros de dominio único, como VH/VL, CH1/CL (kappa o lambda), CH2/CH2 y CH3/CH3. Los dímeros u

30 oligómeros de los dominios de anticuerpo modular también se pueden proporcionar como moléculas monocatenarias o bicatenarias. En particular, los que unen el extremo C de un dominio al extremo N de otro,

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

40 De acuerdo con una realización específica de la presente divulgación, el anticuerpo modular citotóxico es un agente de unión, que es una inmunoglobulina de origen humano o murino, o se puede usar para varios fines, en particular en composiciones farmacéuticas. Por supuesto, la inmunoglobulina modificada también puede ser una inmunoglobulina humanizada o quimérica.

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

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

Un dominio constante es una unidad de pliegue de inmunoglobulina de la parte constante de una molécula de

55 inmunoglobulina, también se denomina dominio de la región constante (p. ej., CH1, CH2, CH3, CH4, Ck, Cl).

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

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

65 un antígeno.

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

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

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

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

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

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

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

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

inmunoglobulinas modificadas que son más adecuadas para el fin del uso diagnóstico o terapéutico.

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

Es particularmente preferente que el anticuerpo modular divulgado en el presente documento se una a dicha diana de la superficie celular mediante al menos parte de un bucle estructural y/o CDR.

En una realización alternativa, es preferente que el anticuerpo modular divulgado en el presente documento se una a dicho ligando efector, o un ligando sustituto para dicho ligando efector, como la proteína A, a través de al menos parte de un bucle estructural y/o bucle CDR, de modo que media en la función efectora.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Las regiones bucles estructurales. del dominio variable de la inmunoglobulina de origen humano, como posibles seleccionadas para fines de modificación se localizan, preferentemente, en el área de los aminoácidos 8 a 20, los aminoácidos 44 a 50, los aminoácidos 67 a 76, los aminoácidos 78 a 87, y los aminoácidos 89 a 101, o dentro de las secuencia terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominios de anticuerpo modular.

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

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

60 De acuerdo con otra realización preferida de la presente divulgación, las regiones bucles estructurales. de un anticuerpo modular o una inmunoglobulina de origen camélido se modifican, por ejemplo en una VHH en la región de los aminoácidos 7 a 19, los aminoácidos 43 a 55, los aminoácidos 68 a 76, los aminoácidos 80 a 87 y los aminoácidos 91 a 101, o dentro de las secuencia terminales, preferentemente dentro de 6 aminoácidos de los extremos C o N del dominios de anticuerpo modular.

65 El método preferido de producir un anticuerpo modular se refiere a la modificación por ingeniería de un anticuerpo modular que se une específicamente al menos a un primer epítipo, que comprende modificaciones en cada uno de al menos dos sitios o bucles dentro de una región bucle estructural, y determinar la unión específica de dicha región bucle estructural a al menos un segundo epítipo, en el que la región bucle estructural sin modificar (región no CDR)

no se une específicamente a dicho al menos un segundo epítipo. Por tanto, un anticuerpo o estructura de unión a antígeno para un primer antígeno se puede mejorar añadiendo otra valencia o especificidad contra un segundo antígeno, en la que la especificidad puede ser idéntica, ya sea frente a diferentes epítopos o frente al mismo epítipo, para aumentar la valencia o para obtener moléculas bi, oligo o multiespecíficas.

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

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

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

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

La fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, ADCP, en ocasiones denominada ADPC, normalmente se investiga junto con la citólisis de células humanas cultivadas. La fagocitosis por los fagocitos, normalmente monocitos humanos o macrófagos derivados de monocitos, mediada por un anticuerpo, se puede determinar del siguiente modo. Los monocitos purificados se pueden cultivar con citocinas para potenciar la expresión de los FcγR o para inducir la diferenciación en macrófagos. Los ensayos de ADCP y ADCC se realizan después con las células diana. La fagocitosis se determina como el porcentaje de células positivas medidas mediante citometría de flujo. La actividad de ADCP positiva se demuestra con una captación significativa del complejo anticuerpo-antígeno mediante los fagocitos. La actividad citotóxica relacionada con la ADCP se mide, preferentemente, como el porcentaje absoluto de la captación del complejo antígeno-anticuerpo mediante los fagocitos, que es, preferentemente, superior al 5 %, más preferentemente, superior al 10 %, incluso más preferentemente superior al 20 %.

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

La actividad apoptótica se mide, preferentemente, usando métodos estándar de determinación de las células moribundas o muertas. Con el fin de medir la necrosis y la apoptosis, se pueden usar ensayos de citotoxicidad. Estos ensayos pueden ser ensayos radioactivos y no radioactivos que miden incrementos en la permeabilidad de la

membrana plasmática, ya que las células moribundas presentan fugas o los ensayos colorimétricos que miden la reducción de la actividad metabólica de las mitocondrias; las mitocondrias en las células muertas no pueden metabolizar los colorantes, mientras que las mitocondrias de las células vivas sí pueden.

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

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

- 15 Preferentemente, la actividad citotóxica del anticuerpo modular de acuerdo con la invención es mediar en la lisis celular o en la muerte celular en un ensayo basado en células con una $CE50 < 10^{-8}$ M, preferentemente en el intervalo nanomolar o inferior.

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

- 25 La actividad citotóxica se diferencia además del simple efecto de inhibición celular en que una sustancia está inhibiendo el crecimiento celular, por ejemplo uniéndose al receptor de un factor de crecimiento, de modo que se bloquea la función del factor de crecimiento, o inhibiendo la angiogénesis. La citotoxicidad se considera esencialmente como un ataque activo para matar células, lo que conduce a la muerte o lisis celular, y, por tanto, se considera una forma altamente eficiente para reducir inmediatamente el número de células malignas o infectadas.

30 En comparación con los compuestos citotóxicos, los inhibidores del crecimiento celular no matan las células inmediatamente, sino que únicamente reducen el crecimiento y la proliferación celular, por lo que se consideran menos activos para fines terapéuticos.

- 35 El anticuerpo modular divulgado en el presente documento puede unirse específicamente a cualquier tipo de moléculas o estructuras de unión. en particular a antígenos, moléculas proteináceas, proteínas, péptidos, polipéptidos, ácidos nucleicos, glicanos, hidratos de carbono, lípidos, moléculas orgánicas, en particular moléculas orgánicas pequeñas, moléculas anorgánicas, o combinaciones o fusiones de los mismos, incluyendo PEG, profármacos o fármacos. El anticuerpo modular preferido de acuerdo con la divulgación puede comprender al menos dos bucles o regiones bucle en las que cada uno de los bucles o regiones bucle pueden unirse específicamente a diferentes moléculas o epítopos.

45 Preferentemente, el antígeno diana de un anticuerpo divulgado en el presente documento se selecciona de antígenos de superficie celular, incluyendo receptores, en particular del grupo que consiste en las tirosinas quinasas receptoras de erbB (tales como EGFR, HER2, HER3 y HER4, en particular los epítopos de los dominios extracelulares de dichos receptores, p. ej., el epítipo 4D5), moléculas de la superfamilia del receptor del TNF, tal como el receptor de Apo-1, TNFR1, TNFR2, el receptor del factor de crecimiento neural NGFR, CD40, moléculas de la superficie de los linfocitos T, receptores de linfocitos T, antígeno OX40 de los linfocitos T, receptor TACI, BCMA, Apo-3, DR4, DR5, DR6, receptores señuelo, tales como DcR1, DcR2, CAR1, HVEM, GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, pero no se limitan a estas moléculas, antígenos de la superficie de los linfocitos B, tales como CD10, CD19, 50 CD20, CD21, CD22, antígenos o marcadores de tumores sólidos o células cancerosas hematológicas, células de linfoma o leucemia, otras células sanguíneas, incluyendo plaquetas, pero no se limitan a estas moléculas.

También divulgado en el presente documento, el antígeno diana se puede seleccionar de los antígenos presentados por las células, como células epiteliales, células de tumores sólidos, células infectadas células sanguíneas, células 55 presentadoras de antígeno y células mononucleares. Dichos antígenos diana expresados y sobreexpresados por las células están, preferentemente, dirigidos, que se seleccionan del grupo que consiste en antígenos asociados a tumores, en particular EpCAM, glicoproteína 72 asociada a tumores (TAG-72), antígeno asociados a tumores CA 125, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno asociado con el melanoma de peso molecular alto (HMW-MAA), antígeno asociado a tumores que expresa hidratos de carbono relacionados con 60 cuerpos de Lewy, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, MUC1 de mucina, MUC18 y antígeno asociado con tumores de citoqueratina, antígenos bacterianos, antígenos víricos, alérgenos, moléculas de IgE relacionadas con la alergia. cKIT y receptor de Fc-epsilon, IRp60, receptor de IL-5, CCR3, receptor de glóbulos rojos (CR1), seroalbúmina humana, seroalbúmina se ratón, seroalbúmina se rata, receptores Fc., receptor FcRn-Fc gamma nononatal, receptores Fc-gamma-- Fc-gamma RI, Fc-gamma RII, Fc-gamma RIII, receptores Fc-alga, 65 receptores Fc-epsilon, fluoresceína, lisozima, receptor 9 de tipo toll, eritropoyetina, CD2, CD3, CD3, CD3, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67),

CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD64, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, LIF, OSM, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, TNF alfa, TNFbeta2, TNF alfa, TNF alfa beta, TNF-R1, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1 BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEG1, OX40L, receptor 1 de TRAIL, receptor A1 de adenosina, receptor beta de linfotinas, TACI, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, integrina beta1, integrina beta1, integrina alfa-4/beta 7, integrina alfa 2, integrina alfa 3, integrina alfa 4, integrina alfa 5, integrina alfa 6, integrina alfa v, integrina alfa V beta 3, FGFR-3, Factor de crecimiento de queratinocitos, GM-CSF, M-CSF, RANKL, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Id, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de linfocitos T B7-1, B7-2, integrina VNR, TGF beta 1, TGF beta 2, eotaxina 1, BLYS (estimulador de los linfocitos B), complemento C5, IgE, IgA, IgD, IgM, IgG, factor VII, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de la endotelina, VLA-4, hidratos de carbono. tales como los antígenos del grupo sanguíneo e hidratos de carbono. relacionados. Galili- Glicosilación, Gastrina, receptores de la gastrina, hidratos de carbono asociados con tumores, protección NP o protección NIP de hapteno, receptor alfa/beta de linfocitos T, E-selectina, P-glicoproteína, MRP3, MRP5, glutatión-S-transferasa o (proteínas de resistencia a múltiples fármacos), proteína de la membrana de gránulos alfa (GMP), 140 digoxina, fosfatasa alcalina de la placenta (PLAP) y fosfatasa alcalina de tipo PLAP testicular, receptor de la transferrina, Heparanasa I, miosina cardíaca humana, glicoproteína 11 b/111 a (GPIIb/IIIa), glicoproteína de la cubierta de gH del citomegalovirus humano (HCMV), gp120 del VIH, HCMV, virus sincitial respiratorio, RSVF, Fgp del RSVF, integrina VNR, gp120 de Hep B, CMV, gp11b/IIIa, bucle V3 de gp120 de HIV IIIB, Fgp del virus sincitial respiratorio (RSV), glicoproteína gD del virus del herpes simple (VHS) glicoproteína gB del VHS, glicoproteína de la cubierta gB del HCMV, toxina de Clostridium perfringens y fragmentos de la misma.

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

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

La variante de afinidad madurada preferida de un anticuerpo modular de acuerdo con la invención exhibe al menos un incremento por 10 en la afinidad de la unión, preferentemente un incremento de al menos 100 veces. La maduración de la afinidad se puede usar en el curso de las campañas de selección que usan las respectivas bibliotecas de moléculas parentales, bien con anticuerpos modulares con una afinidad de unión media para obtener el anticuerpo modular de la invención que tiene la propiedad de unión a la diana específica de una afinidad de unión $K_d < 10^{-8}$ M y, opcionalmente, una potencia de $CI_{50} < 10^{-8}$ M. Como alternativa, la potencia de unión o afinidad se puede aumentar todavía más mediante la maduración de la afinidad del anticuerpo modular de acuerdo con la invención para obtener los elevados valores correspondientes a una K_d o CI_{50} inferior a 10^{-9} M, preferentemente inferior a 10^{-10} M o incluso inferior a 10^{-11} M, lo más preferido, en el intervalo picomolar.

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

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

Normalmente, la afinidad de un anticuerpo se correlaciona bien con la CI_{50} , cuando se determina en un ensayo de unión de saturación. La afinidad de un antagonista por su sitio de unión (K_i) se entiende como su capacidad para unirse a un receptor, que determina la duración de la unión y la respectiva actividad agonista. Las medidas para

aumentar la afinidad mediante maduración de la afinidad normalmente también aumenta la potencia de la unión, lo que tiene como resultado la correspondiente reducción de los valores de CI50 en el mismo intervalo de los valores de Kd.

- 5 Los valores de CI50 y Kd se pueden determinar usando los ensayos de unión de saturación bien conocidos en la técnica. Al contrario que los ensayos de competición, los ensayos de unión de saturación proporcionan un valor independiente de la concentración de un competidor, por tanto, un valor comparable que puede ser indicativo de la afinidad de unión in vivo.
- 10 El anticuerpo modular de acuerdo con la invención se conjuga, preferentemente, con una molécula marcadora o indicadora, seleccionada del grupo que consiste en moléculas orgánicas, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, marcadores coloreados, marcadores fluorescentes, marcadores cromogénicos, marcadores luminiscentes, haptenos, digoxigenina, biotina, complejos metálicos, metales, oro coloidal y mezclas de los mismos. Se pueden usar inmunoglobulinas modificadas conjugadas con moléculas marcadoras o indicadoras, por ejemplo, en sistemas de ensayo o métodos diagnósticos.
- 15

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

- 20 En una realización preferida, las variantes de anticuerpo se someten a detección selectiva usando uno o más ensayos basados en células o in vivo. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas modificadas purificadas o sin purificar normalmente se añaden exógenamente de un modo tal que las células se exponen a inmunoglobulinas individuales o conjuntos de inmunoglobulinas que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos normalmente se basan, aunque no siempre, en la función de la inmunoglobulina, es decir, la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana y participar en algún acontecimientos bioquímico, por ejemplo, función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis, y similares. Dichos ensayos a menudo implican monitorización de la respuesta de las células al anticuerpo, por ejemplo la supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional, tal como expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de anticuerpos para producir ADCC, ADCP, CDC o actividad apoptótica.
- 25
- 30 Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, es decir además de las células diana, por ejemplo, complemento sérico, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, y similares. Dichas células adicionales pueden proceder de cualquier organismo, preferentemente seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los anticuerpos modulares pueden producir apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan la diana o pueden mediar en el ataque sobre las células diana por células inmunitarias que se han añadido al ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte celular o la viabilidad celular son conocidos en la técnica e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunológicos, citoquímicos y radioactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción de la caspasa pueden permitir medir la apoptosis y la captación o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes, tales como azul alamar, pueden permitir la monitorización del crecimiento activación celular.
- 35
- 40

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

- 45 La activación de la transcripción también puede servir como método para analizar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta se puede monitorizar analizando los genes naturales o inmunoglobulinas que pueden regularse por aumento, por ejemplo, se puede medir la liberación de determinadas interleucinas. o, como alternativa, la lectura se puede realizar a través de una construcción indicadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medida de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de anticuerpos modulares. Tipos de células para dichos ensayos pueden ser células procariotas o eucariotas, y se puede usar diversas líneas celulares conocidas en la técnica. Como alternativa, la detección selectiva basada en células se realiza usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Es decir, las variantes de anticuerpos no se añaden exógenamente a las células. Por ejemplo, en una realización, la detección selectiva basada en células usa expresión en superficie celular. Se puede usar una pareja de fusión que permita expresar inmunoglobulinas modificadas sobre la superficie celular (Wittrup, 2001, Curr Opin Biotechnol, 12:395-399).
- 50
- 55

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

65

Las propiedades biológicas del anticuerpo modular de acuerdo con la invención se pueden caracterizar in vivo en experimentos con tejido celular y organismos enteros. Como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se analizan in vivo en animales, incluyendo, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para

5 medir la farmacocinética de un fármaco, la farmacodinamia, la toxicidad, y otras propiedades. Se puede hacer referencia a los animales como modelos de enfermedad. A menudo, los agentes terapéuticos se prueban en ratones, incluyendo, entre otros, ratones atímicos, ratones SCID, ratones con xenoinjertos, y ratones transgénicos (incluyendo activados e inactivados). Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial del anticuerpo a usar como agente terapéutico con la semivida adecuada, función

10 efectora, actividad apoptótica, actividad citotóxica o citolítica adecuadas. Cualquier organismo, preferentemente mamíferos, se puede usar para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los primates, monos, pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por tanto, se pueden usar para probar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética, la farmacodinamia, la semivida, u otra propiedad del anticuerpo modular de acuerdo con la invención. Las pruebas de las sustancias en seres humanos son necesarias, en última instancia, para la

15 aprobación de los fármacos y, por tanto, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Por consiguiente, los anticuerpos modulares de la presente invención se pueden analizar en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, Inmunogenicidad, farmacocinética, y/u otras propiedades clínicas. Especialmente, los anticuerpos modulares de acuerdo con la invención que se unen a células únicas o a un complejo celular a través de al menos dos motivos de unión, preferentemente la unión de al menos tres estructuras con reticulación con las

20 células diana, se considerarían eficaces en la actividad efectora o la actividad preapoptótica o apoptótica tras la reticulación y dirección celular. La unión multivalente proporciona una asociación relativamente grande de las parejas de unión, también denominado reticulación, que es un requisito previo para la apoptosis y la muerte celular.

El anticuerpo modular de la presente invención puede encontrar uso en una amplia gama de productos de anticuerpos. En una realización, el anticuerpo modular de la presente invención se usa para terapia o profilaxis, por

25 ejemplo como inmunoterapia activa o pasiva, para uso preparativo, industrial o analítico, como compuesto diagnóstico, industrial o reactivo de investigación, preferentemente un agente terapéutico. El anticuerpo modular puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para capturar o matar células diana que portan el

30 antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una realización alternativa, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo, antagonizando una citocina o receptor de citocinas.

En una realización preferida alternativa, los anticuerpos modulares de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar los factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento y, de este modo, mediar

35 en la muerte de las células diana portadoras o que necesitan el antígeno diana.

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

40

En una realización preferida, un anticuerpo modular se administra a un paciente para tratar un trastorno específico. Un "paciente", para los fines de la presente invención, incluye seres humanos y otros animales, preferentemente

45 mamíferos y, lo más preferentemente, seres humanos. Por "trastorno específico" se quiere decir, en el presente documento, un trastorno que se puede mejorar mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende una inmunoglobulina modificada de la presente invención.

En una realización, un anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Como alternativa, el anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos, incluyendo, entre otros,

50 agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de la quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. El anticuerpo modular se puede administrar de forma concomitante con uno o más de otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo modular de la presente invención se puede administrar al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o ambos, quimioterapia o terapia de radiación. En una realización, el

55 anticuerpo modular de acuerdo con la presente invención se puede administrar en combinación con uno o más anticuerpos, que pueden o no comprender un anticuerpo modular de la presente invención. De acuerdo con otra forma de realización de la invención, el anticuerpo modular de la presente invención y una o más terapias anticancerosas se usan para tratar las células cancerosas ex vivo. Se contempla que dicho tratamiento ex vivo puede ser útil en el trasplante de médula ósea y, en particular, trasplante autólogo de médula ósea. Por supuesto,

60 se contempla que los anticuerpos de la invención se puedan usar en combinación con otras técnicas terapéuticas más, tales como cirugía.

Otros diversos agentes terapéuticos pueden encontrar uso para la administración con el anticuerpo modular de la presente invención. En una realización, el anticuerpo modular se administra con un agente antiangiogénico, que es

65 un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede, por ejemplo, ser una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, una molécula de fusión

Fc. o citocina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en la estimulación de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En realizaciones alternativas, el anticuerpo modular se administra con un agente terapéutico que induce o potencia la respuesta inmunológica adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo dirigido a CTLA-4. En una realización alternativa, la inmunoglobulina modificada se administra con un inhibidor de la tirosina quinasa, que es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, el anticuerpo modular de la presente invención se administra con una citocina. Por "citocina", como se usa de acuerdo con la presente invención, se quiere decir un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares, incluyendo quimiocinas.

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

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

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

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

Otro aspecto importante de la divulgación es que cada potencial dominio de unión permanece físicamente asociado a la molécula de ADN o de ARN completa que lo codifica, y, además, las proteínas de fusión oligomerizan en la superficie de un paquete genético. para presentar el polipéptido de unión en la estructura oligomérica nativa y funcional. Una vez que se han identificado dominios de unión satisfactorios, se puede obtener fácilmente el gen para expresión, recombinación o fines de ingeniería adicionales. La forma que toma dicha asociación es un "paquete genético replicable", tal como un virus, célula o espora que se replica y expresa el gen que codifica el dominio de unión, y transporta el dominio de unión a su superficie externa. Otra forma es un paquete genético, replicable in vitro, tal como ribosomas que unen el ARN de codificación con la proteína traducida. En la expresión en ribosomas, el material genético se replica mediante amplificación enzimática con polimerasas.

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

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

Preferentemente, en el método divulgado en el presente documento, el vector o plásmido del paquete genético está bajo el control estrecho del elemento regulador de la transcripción, y las condiciones de cultivo se ajustan de forma

que la cantidad o el número de partículas de vector o fagemido que muestran menos de dos copias de la proteínas de fusión sobre la superficie de la partícula es inferior a aproximadamente un 20 %. Más preferentemente, la cantidad de partículas de vector o fagemido que muestran menos de dos copias de la proteína de fusión es inferior al 10 % de la cantidad de partículas que muestran una o más copias de la proteína de fusión. Lo más preferentemente, la cantidad es inferior al 1 %.

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

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

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

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

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

Con varios fines, puede ser ventajoso introducir mutaciones silentes en la secuencia que codifica el inserto de la biblioteca. Por ejemplo, se pueden introducir sitios de restricción que facilitan la clonación o el intercambio modular de partes de la secuencia. Otro ejemplo para la introducción de mutaciones silentes es la capacidad para "marcar" bibliotecas, que significa darles un codón específico en una posición seleccionada, lo que les permite (o a los clones seleccionados derivados de los mismos), por ejemplo, ser reconocidos durante las siguientes etapas, en las que, por ejemplo, diferentes bibliotecas con diferentes características se pueden mezclar y usar como mezcla en el procedimiento de adsorción.

La divulgación también proporciona un método para producir un oligómero de dominios de anticuerpo modular que se unen a una diana, que comprende las etapas de:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Como se conoce en la técnica, existen varias tecnologías de expresión y selección que se pueden usar para la identificación y aislamiento de proteínas con determinadas características y afinidades de unión. incluyendo, por ejemplo, tecnologías de expresión, tales como celulares y no celulares, en particular sistema de expresión

movilizados. Entre los sistemas celulares, se pueden usar expresión en fagos, expresión en virus, expresión en levaduras o en otras células eucariotas, tales como expresión en células de mamífero o de insectos. Los sistemas movilizados están relacionados con los sistemas de expresión en la forma soluble, tales como sistemas de expresión in vitro, entre ellos la expresión en ribosomas, expresión de ARNm o expresión de ácido nucleico.

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

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

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

Ejemplos

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

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

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

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

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

NotI en el extremo 3'.

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

5 SEC ID N° 4 (cebador para PCR EPKSNCO)
ccatggccgagcccaaatctgtgacaaaactc
SEC ID N° 5 (cebador para PCR CH3LSAC)
agtcgagctcgtcacgggatggggcaggg
10 SEC ID N° 6 (cebador para PCR CH3CSAC)
gtacgagctcnnnsnnscaagtcagcctgacctgcctgg
SEC ID N° 7 (cebador para PCR CH3CHIN)
tgccaagctgtgtagaggaagaaggagccg
SEC ID N° 8 (cebador para PCR CH3RHIN)
15 tgccaagcttaccgtgnnsnnsnnsaggtggnnsnnsagggaacgtcttctcatgctccg
SEC ID N° 9 (cebador para PCR CH3RNOT) agttgcggccgctttaccggagacagggagag

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

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

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

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

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

45 Tabla 1. Código de ambigüedad de nucleótidos de la IUPAC

Símbolo	Significado	Ácido nucleico
A	A	Adenina
C	C	Citosina
G	G	Guanina
T	T	Timina
U	U	Uracilo
M	A o C	
R	A o G	
W	A o T	
S	C o G	
Y	C o T	
K	G o T	
V	A o C o G	
H	A o C o T	
D	A o G o T	
B	C o G o T	
X	G o A o T o C	
N	G o A o T o C	

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

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

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

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

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

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

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

Optimización del ligador:

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

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

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

Los métodos de selección de la biblioteca de ligadores para los ligadores óptimos dependen de la aplicación, pero básicamente debe ser para seleccionar todas las propiedades que se desea tener en determinada metodología. El enriquecimiento contra un antígeno difícil de seleccionar puede producir secuencias ligadoras que permiten a los miembros de la biblioteca de un buen acceso a los antígenos. La incubación en las soluciones de proteasas o en otras condiciones adversas o pases frecuentes a través de células huésped en condiciones proteolíticas (por ejemplo, antiguos cultivos microbianos) puede ser una selección adecuada de los ligadores de expresión estables

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

Optimización del ligador Fcab01:

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

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

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

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

El ELISA del fago se realizó del siguiente modo:

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

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

Ejemplo 4: Diseño de la biblioteca Fcab™

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

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

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

selección (en términos de frecuencia de los ligadores contra ligadores diferentes y en términos de afinidad).

Flexibilidad del bucle:

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

10

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

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

15

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

Diseño de aleatorización de bucle en levaduras

20

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

25

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

30

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

35

Nombre de la biblioteca	tamaño teórico	Bucle AB	Bucle CD	Bucle EF	Clones independientes
Fcab05	$2,0 \times 10^{22}$	ZXXXX	NGQPE	(XXXXX)XXXRWXX	$2,2 \times 10^4$
Fcab05sABCD	$7,5 \times 10^{31}$	XXXXX	XXXXX	(XXXXX)XXXRWXX	$1,1 \times 10^6$
Fcab05sCD	$6,8 \times 10^{29}$	ZXXXX	XXXXX	(XXXXX)XXXRWXX	$8,6 \times 10^6$
Fcab05sAB	$1,3 \times 10^{24}$	XXXXX	NGQPE	(XXXXX)XXXRWXX	53×10^7
Fcab07	$3,4 \times 10^{10}$	LTKNQ	NGQPE	XXXXXXX	$5,3 \times 10^7$
Fcab07AB	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXX	$4,8 \times 10^6$
Fcab07ABb	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXX	$1,3 \times 10^7$
Fcab07b	$3,4 \times 10^{10}$	LTKNQ	NGQPE	XXXXXXX	37×10^7
Fcab07CD	$1,2 \times 10^{18}$	LTKNQ	XXXPE	XXXXXXX	$1,9 \times 10^7$
Fcab07CDAB	$3,9 \times 10^{25}$	XXXXX	XXXPE	XXXXXXX	$1,7 \times 10^7$
Fcab08	$3,4 \times 10^7$	XXXXX	NGQPE	DKSRWQQ	$8,5 \times 10^6$
Fcab08EF	$1,2 \times 10^{18}$	XXXXX	NGQPE	XXXXXXX	22×10^7

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

40

El pYD1 (Invitrogen) se utiliza como el vector básico. El vector se modifica de la siguiente manera, con el fin de eliminar un sitio XhoI: pYD1 se escinde con XhoI, se trata con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa y se vuelve a ligar. La secuencia resultante se da en pYD1dX (SEC ID N° 15 / Figura 8). pYD1dX contiene un sitio de restricción BamHI único en la posición 921/925 y un sitio de restricción NotI único en la posición 963/967. Se abre

con estas dos enzimas de restricción. Un inserto que codifica CH1-bisagra-CH2-CH3 de la IgG1 humana se prepara mediante PCR a partir de ADNc que codifica la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal IgG1 humana. En este inserto se introduce una mutación puntual usando procedimientos estándar para mutar el residuo de cisteína en C-terminal del dominio CH1 a una serina. El inserto se amplifica usando cebadores de PCR que se unen a un sitio de restricción BamHI y Not en ambos extremos respectivamente. Estos sitios de restricción se utilizan después para clonar el inserto en pYD1dX para producir el vector de expresión pYD1dXFc (SEC ID N° 16 / Figura 9).

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

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

15 Clonación de las bibliotecas

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

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

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

gapch35

caacaaggccctgcctgcccccatcgagaagaccatctccaaggccaagggccagcctcgagaaccacaggtgtac
accctgccc (SEC ID N° 24) y

gapfcs3

gagaccgaggagaggggttagggataggcttaccttgaagggccctctagactcgatcgagcgccgctcatttacc
ggagacagggagagctc ttc (SEC ID N° 25)

100 µg del vector pYD1CH12 escindido con XhoI y 100 µg del inserto se mezclan y se transforman en la cepa EBY100 de *Saccharomyces* (Invitrogen) utilizando el procedimiento de acetato de litio de acuerdo con el siguiente protocolo, que se mejora con un factor de 100 para transformar la cantidad requerida de células y de ADN. En resumen, para una única transformación de 1 µg de ADN del vector y 1 µg de ADN del inserto se inoculan 10 ml de

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

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

Lista de cebadores

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

CDmut_back (SEC ID N° 430): 5'-GCT CTC CCA CTC CAC G-3'
CDmut_back (SEC ID N° 430): 5'-CAC GGT GAG CTT GCT GTA GAG-3'
ABMUT5/2_back (SEC ID N° 432): 5'-CTCATCCCGGGATGGG-3'

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

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

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

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

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

- d) CH3seqAS (SEC ID N° 437): 5'-TAGAATCGAGACCGAGG-3'
e) YCH3.25rec.opt.for (SEC ID N° 438): 5'-A CCA TCT CCA AGG CCA AGG-3'
f) Ych3.25rec.back (SEC ID N° 439): 5'-AAG GGC CCT CTA GAC TCG-3'

Cultivo-Inducción

Las bibliotecas de levaduras recolectadas (bibliotecas y Fcab) se inoculan en 10 ml de medio SD-CAA (10 g/l de base de nitrógeno para levaduras, 10 g/l de aminoácidos, y 20 g/l de dextrosa. 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de

NaH₂PO₄2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄7H₂O) y se cultivan en un agitador a 250 rpm a 28 °C durante 6.8 horas. La DO600 del cultivo se determina y el cultivo se diluye hasta una DO600 de 0,2 y se cultiva en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO600 de 1-2. Las células se recolectan mediante centrifugación (3.000 rpm /5 min/ 4° C) y se resuspenden en medio de inducción SG/R-CAA (10 g/l de base de nitrógeno de levadura, 10 g/l de casa aminoácidos, y 20 g/l de galactosa, 10 g/l de rafinosa, 0,1 g/l de leucina, 9,67 g/l de NaH₂PO₄2H₂O y 10,19 g/l de Na₂HPO₄7H₂O). Los cultivos se inducen mediante incubación durante 2 días en un agitador a 250 rpm a 20 °C y después se analizan y clasifican. Como alternativa, los cultivos se inducen mediante incubación durante 1 día en un agitador a 250 rpm a 37 °C y después se analizan y clasifican.

10 Control de calidad de las bibliotecas yFcab

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

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

Biotinilación del antígeno (Her2)

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

La calidad del antígeno biotinilado se analiza mediante LISA. En primer lugar, las placas se revisten con un anticuerpo anti-HEer2 (p. ej., Herceptin) a 10 µg/ml en PBS, 100 µl/pocillo durante la noche a 4 °C. después, la placa se lava 3 veces con tampón de lavado (WB)(PBS + 0,05 % de Tween20) y se bloquea mediante tampón de bloqueo (BB) (PBS + 2 % BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con WB, se añaden diferentes concentraciones de Her2-biotina en 100 µl/pocillo de BB durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de lavado 3 veces con WB. Por último, la placa se incuba con 1-25.000 de estreptavidina-HRP (GE healthcare) en BB durante 1 hora a temperatura ambiente y se lava 3 veces con WB. El color se desarrolla añadiendo 100 µl/pocillo del sustrato TMB (Sigma) tras aproximadamente 10 minutos, la reacción se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de 30 % de H₂SO₄. Los resultados se analizan con un lector de ELISA a 450-630 nm.

Ejemplo 6: Producción de Fcab específicos de antígeno (Her2)

55 Selección de Fcab específicas de antígeno (Her2) usando FACS

Primera ronda de selección

60 Dos días antes de la clasificación con FACS, una biblioteca de levaduras que contiene 2,5 x10⁸ clones de Fcab se induce con medio SG/R- CAA para expresar los Fcab sobre la superficie celular como se ha descrito anteriormente. Tras dos días, la cantidad de células que cubren, por ejemplo, 19 veces la biblioteca (= 2,5 x10⁹), se incuba durante 30 minutos en hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 2 ml de SB. Después, las células se lavan una vez con SB frío y después se incuban durante 30 minutos en hielo con estreptavidina-PE (de R&D systems) diluido a 1: 100 en SB. Las células se lavan dos veces con SB frío helado hasta una concentración final de 1x10⁹ células / ml. Las tinciones control con 5x10⁶ células / ml en 100 µl se realizan solo estreptavidina-PE, en ausencia de antígeno. Tanto la biblioteca completa como las tinciones control se analizan por ejemplo, un FACS ARIA de BD.

Para configurar las puertas para la clasificación se utilizan las células control. Primero, se establece una puerta SSC FSC (G1) para identificar células de levadura sanas del gráfico del área de FSC frente a la anchura de FSC de G1 y solo se seleccionan las células que no se agregan en una nueva puerta (G2). Las células en G2 se analizan después para determinar la reactividad con estreptavidina-PE usando FSC frente a FL-2 (canal de PE). G3 se establece para

5 inducir un 01, % de células positivas (falsas). Posteriormente, al menos 5×10^8 células teñidas (dos veces el tamaño de la biblioteca, idealmente más) se analizan con los parámetros como se ha indicado anteriormente y las células en G3 se clasifican en un tubo que contiene 2-3 ml de medio SD-CAA. Aproximadamente 5×10^5 células (Conjunto 1) se recogen en la primera ronda de selección y se propagan durante de 1 a 2 días, tras lo cual, las células se pueden almacenar a -80°C y los alícuotas se pueden inducir para expresar los Fcab como se ha descrito anteriormente.

10 Tras dos días más puede tener lugar la siguiente ronda de selección.

Segunda ronda de selección:

El conjunto 1 seleccionado en la ronda 1 se induce para expresar el Fcab sobre su superficie como se ha descrito anteriormente. Al menos 5×10^6 células (que comprenden múltiples copias del conjunto 1) se incuban durante 30 minutos en hielo con antígeno biotinilado 500 nM (Her2) en 1 ml de SB. Después, las células se lavan una vez con SB frío y después se incuban durante 30 minutos en hielo con estreptavidina-PE (de R&D systems) diluido a 1:100 en SB junto con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína A-FITC (Fluka). A continuación, las células se lavan dos veces con SB frío helado hasta una concentración final de 2×10^9 células / ml. Además, se realizan tinciones control en las que

20 5×10^6 células/ml del Conjunto 1 en 100 μl se incuban con una mezcla de proteína A y estreptavidina-PE como se ha indicado anteriormente, pero sin la incubación con el antígeno (Her2). Además, 5×10^5 células en 100 μl de un clon de levadura que expresa el fragmento Fc no aleatorizado de Fcab wt) se tiñen con Prot A - FITC como se ha descrito en lo que antecede en ausencia de estreptavidina-PE. Las células que expresan Fcab-wt se analizan en, por ejemplo, FACS ARIA de BD para configurar las puertas para la clasificación. Primero, se establece una puerta SSC FSC (G1) para identificar células de levadura sanas, del gráfico del área de FSC frente a la anchura de FSC de G1 y solo se seleccionan las células que no se agregan en una nueva puerta (G2). Las células en G2 se analizan después para determinar la expresión de la proteína A usando FSC frente a FL-1 (FITC). G3 se configura para cubrir las células positivas a la proteína A (50-60 % de la puerta parental) y G4 se configura para cubrir las células débilmente

25 positivas a prot A (20-30 % de células parentales). G3+G4 incluirán aproximadamente el 70-80 % de todas las células en G2. Ahora, el conjunto de células teñidas para estreptavidina-PE en presencia de Prot A-FITC se usan para establecer el resto de las puertas de clasificación. Primero se comprueban G1 y G2 con el conjunto de células y, si es necesario, se ajustan. El conjunto de células tendrá menos episodios en G3 y, quizá también en G4, lo que indica que no todas las células del conjunto 1 expresan Fcab que se pliega como Fcab-wt. Usando el conjunto de células teñidas control, se prepara una nueva puerta para G3 y para G4. Las nuevas puertas se configuran en el gráfico de FSC y FL-2 (PE). Se prepara una puerta (G5) que incluye 0,1 % de células positivas a estreptavidina

35 (falsas) en G3 y lo mismo se realiza para las células en G4, que da lugar a G6. En la siguiente etapa, al menos 5×10^6 células teñidas para HER2-biotina + estreptavidina-PE y Prot A-FITC se clasifican mediante FACS-ARIA. Las células se recogen de G5 (conjunto 2,1 y G6 (conjunto 2.2) en tubos separados que contienen 2-3 ml de medio de cultivo para levaduras. Cabe esperar entre 10 y 1000 clones de ambas puertas. Ambos conjuntos nuevos se propagan durante 1 o 2 días y se almacenan a -80°C . Las células de 2,1 y 2.2 se pueden usar para dirigir clasificación adicional en una tercera ronda o se pueden someter (preferentemente después de mezclar los dos clones de nuevo) a una ronda de aleatorización adicional del bucle AB (maduración de la afinidad) antes de clasificar adicionalmente en el FACS.

45 Maduración de la afinidad para clones/conjuntos determinados

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

El segundo cebador usado en estas PCR es gapfcs3 en ambos casos. Con el fin de crear secuencias flanqueantes para una reparación de huecos eficiente en levaduras, los productos de la PCR resultantes se amplificaron adicionalmente con el par de cebadores gapch35 y gapfsc3 y después se transformaron en la cepa EBY100 de *Saccharomyces cerevisiae* mediante transformación con acetato de litio junto con pYD1CH12 digerido con Chol como se ha descrito en lo que antecede. Como cebadores alternativos, para la aleatorización de los residuos

60 descritos en el bucle AB, los cebadores tales como Abmut1L (gaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggtgatgagctgnnbnnbnbnbnbcaggt- cagcctgacctgctgtgca aag, SEC ID N° 28) o Abmut1R (gaaccacaggtgtacaccctgccccatcccggtgatgagctgnnbnnbnbnbn- nbgtcagcctgacctgctgtgca aag, SEC ID N° 29) también se usaron. De forma análoga, los residuos en el bucle EF se aleatorizaron mediante aleatorización total.

65 Como alternativa, la aleatorización se realizó usando oligonucleótidos enriquecidos como cebadores sobre el clon individual y- Her.C2.P4.2-9. En este caso, los oligos se diseñaron de un modo similar a lo mencionado anteriormente

para la aleatorización completa de los respectivos bucles. no obstante, la parte aleatorizada contenía 70 % de la base original en la primera y segunda posición del codón y 10 % de cada uno de los otros 3 nucleótidos. La tercera posición contenía un 70 % de la base original y 30 % de la base de acuerdo con el codón NNK y NNS.

- 5 El cebador Abmut tuvo como resultado 8.000 nuevas variantes (Conjunto 2.3) de cada clon y el cebador Abmut2LR conducen a 3×10^6 nuevas variantes (Conjunto 2.4) tras la aleatorización completa. Por tanto, los conjuntos 2.3 y 2.4 tuvieron como resultado nuevas bibliotecas de aproximadamente 10^8 individuos, ya que el material de partida (Conjunto 2.1 +2.2) ya contenía aproximadamente 10-1.000 clones.

10 Tercera ronda de selección

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

Análisis de los clones:

- 25 Los clones individuales de los conjuntos que contienen las células Her2/Prot (se prefiere >20 %) se prepararon sembrando los conjuntos en placas de agar con medio SD-CAAo mediante transferencia de las células únicas (=clones) directamente desde el FACS ARIA a placas sin generar un conjunto. Se dejan cultivar los clones y se transfieren a cultivos líquidos y se almacenan a -80 °C. Los alícuotas de los clones se indujeron después para expresar Fcab sobre su superficie celular como se ha descrito en lo que antecede y se someten a detección
30 selectiva para una serie de parámetros en el FACS. Estos parámetros fueron: un intervalo de respuesta a la dosis del antígeno usado para la selección (Her2) con y sin la presencia de Prot A- FITC. Tinción de CD64 como se ha descrito en lo que antecede. Además, el uso de protocolos de tinción similares se realizó la detección selectiva de una serie de antígenos biotinilados irrelevantes para identificar los Fcab sin reacciones cruzadas.
- 35 Se observó que, tras varias rondas de selección de células positivas para antígeno (Her2) + Prot A, un gran porcentaje de clones muestran > 25 % de positividad al antígeno (Her2) cuando se tiñen con el antígeno (Her2) 500 nM y > 70 % de positividad a la proteína A cuando se tiñen con 2 ug/ml de Prot A-FITC. En la mayoría de los casos, estos clones también mostraron > 50 % de unión a CD64. Por tanto, esto refleja los niveles de tinción con Prot A y CD64 de los fragmentos Fc no aleatorizados (Fcab wt) expresados en levaduras.

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

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

Nombre del clon	Bucle AB AA143ff	Bucle EF AA198ff
Fcab wt	LTKNQ	DKSRWQQ
y-Her.C2-P3.1-1	LDNSQ (SEC ID N° 30)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
y-Her.C2-P3.1-3	YEGSS (SEC ID N° 31)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
y-Her.C2-P3.1-5	YMSAD (SEC ID N° 32)	SRRDSSLRWAH (SEC ID N° 53)
y-Her.C2-P3.1-6	YRRGD (SEC ID N° 33)	APGSKGYRRWAL (SEC ID N° 54)
y-Her.C2-P3.1-8	LMSRQ (SEC ID N° 34)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
y-Her.C2-P3.1-16	LHLAQ (SEC ID N° 35)	SINDLINHRWPY (SEC ID N° 56)

y-Her.C2-P3.1-18	YLSKD (SEC ID N° 36)	MWGSRDYWRWSH (SEC ID N° 57)
y-Her.C2-P3.2-3	YRSGS (SEC ID N° 37)	NSGSAMMVRWAH (SEC ID N° 58)
y-Her.C2-P3.2-9	LRDQG (SEC ID N° 38)	QRSRLSRQRWWR (SEC ID N° 59)
y-Her.C2.P4.2-1	YSANT (SEC ID N° 39)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-3	YASNT (SEC ID N° 40)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-4	YSDGD (SEC ID N° 41)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-5	YSGGS (SEC ID N° 42)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-6	YGRDS (SEC ID N° 43)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-8	YAGGT (SEC ID N° 44)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-10	YSSDS (SEC ID N° 45)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-12	YHSGS (SEC ID N° 46)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-15	YLTNS (SEC ID N° 47)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-18	YGSEE (SEC ID N° 48)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-19	YRSGE (SEC ID N° 49)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-20	YGTDD (SEC ID N° 50)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
y-Her.C2.P4.2-9	YLHGD (SEC ID N° 161)	ARYSPRMLRWAH (SEC ID N° 60)
HAF1311A1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRYSMTMWRWAH (SEC ID N° 61)
HAF1311A10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSRSMMRWAH (SEC ID N° 62)
HAF1311A11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQMMWRWAH (SEC ID N° 63)
HAF1311A12	YLHGD (SEC ID N° 161)	ITRYSRQMLRWAH (SEC ID N° 64)
HAF1311A2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSALMWRWAH (SEC ID N° 65)
HAF1311A3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSEAMWKWGH (SEC ID N° 66)
HAF1311A4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 67)
HAF1311A5	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
HAF1311A6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRHSPTMWKWAH (SEC ID N° 69)
HAF1311A7	YLHGD (SEC ID N° 161)	LGRWSPKMWRWAH (SEC ID N° 70)
HAF1311A8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMMRWAH (SEC ID N° 71)
HAF1311A9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSPSMWRWAH (SEC ID N° 83)
HAF1311B1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMVRWAH (SEC ID N° 84)
HAF1311B10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARKNHRKWRTH (SEC ID N° 85)
HAF1311B11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRYSPTMWQWAH (SEC ID N° 86)
HAF1311B12	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1311 B2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSQTMMWRWAH (SEC ID N° 88)
HAF1311 B3	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRFSPSMWRWAH (SEC ID N° 89)
HAF1311B4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRYSQSMWRWAH (SEC ID N° 90)
HAF1311B5	YLHGD (SEC ID N° 161)	IERYSTRMWSWAH (SEC ID N° 91)
HAF1311B6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPMWHWAH (SEC ID N° 92)
HAF1311B7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARGSPSMWSWGH (SEC ID N° 93)
HAF1311B8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSQTMWHWAH (SEC ID N° 94)
HAF1311B9	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARYSPGMWRWAH (SEC ID N° 95)
HAF1311C1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRFSPTMWKWAH (SEC ID N° 96)
HAF1311C10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRWSRTMLRWAH (SEC ID N° 97)
HAF1311C11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSRPMWRWAH (SEC ID N° 98)
HAF1311C2	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARHSKSMWSWAH (SEC ID N° 99)
HAF13112C3	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRWSKSLSGWAH (SEC ID N° 100)
HAF1311C5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYTPSMWRWAH (SEC ID N° 101)
HAF1311C7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSLTMWRWAH (SEC ID N° 102)
HAF1311C8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWKWAH (SEC ID N° 103)
HAF1311C9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1311D2	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSLSRWAH (SEC ID N° 105)
HAF1311D3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)
HAF1311D4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRSSLTMWKWAH (SEC ID N° 107)
HAF1311D5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSTRMWKWAH (SEC ID N° 108)

HAF1311D6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 109)
HAF1311D7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRYSPSMWRWAH (SEC ID N° 110)
HAF1311E10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 109)
HAF1311 E2	YLHGD (SEC ID N° 161)	MPRWSKSLSGWAH (SEC ID N° 100)
HAF1311 E3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRHSSSMWRWAH (SEC ID N° 111)
HAF1311 E4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSRSMKKWAH (SEC ID N° 112)
HAF1311 E5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARGSTTMWRWGH (SEC ID N° 113)
HAF1311E6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPEMWRWAH (SEC ID N° 114)
HAF1311E7	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSTGMWNWAH (SEC ID N° 115)
HAF1311 E8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 116)
HAF1311 E9	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRNSPRMWRWAH (SEC ID N° 117)
HAF1312F1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMSRWAH (SEC ID N° 118)
HAF1312G12	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMKSWAH (SEC ID N° 119)
HAF1312F11	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRYSTKMKRWAH (SEC ID N° 120)
HAF1312F7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)
HAF1312F3	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
HAF1312F5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRWTPSMWRWAH (SEC ID N° 123)
HAF1312G10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VKRSSPSMWRWAH (SEC ID N° 124)
HAF1312G2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1312G1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARYSPGMWNWAH (SEC ID N° 125)
HAF1312G9	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPNMWNWAH (SEC ID N° 126)
HAF1312G8	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1312F12	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMLKWAH (SEC ID N° 128)
HAF1312F2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSKSMLKWAH (SEC ID N° 129)
HAF1312F10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSRTMWRWGH (SEC ID N° 130)
HAF1312G7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARHSREMLRWAH (SEC ID N° 131)
HAF1312F8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSSTMSRWAH (SEC ID N° 132)
HAF1321A1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQRMWRWAH (SEC ID N° 116)
HAF1321B11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSQMMWRWAH (SEC ID N° 63)
HAF1321A2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSPRMWRWAH (SEC ID N° 98)
HAF1321A10	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
HAF1321A4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRHSLKKLQRKH (SEC ID N° 133)
HAF1321 B10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1321A5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWNWAH (SEC ID N° 134)
HAF1321B1	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPTMWKWAH (SEC ID N° 148)
HAF1321A11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARFSPSMWRWAH (SEC ID N° 104)
HAF1321B5	YLHGD (SEC ID N° 161)	VSRFSPSMWRWAH (SEC ID N° 149)
HAF1321B2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VGRWTPSMWRWAH (SEC ID N° 123)
HAF1321B6	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1321B7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
HAF1321B9	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRYTPSMWRWAH (SEC ID N° 150)
HAF1322C10	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
HAF1322C11	YLHGD (SEC ID N° 161)	VPRYSTLMWRWAH (SEC ID N° 151)
HAF1322C7	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRHSRRMWRWAH (SEC ID N° 152)
HAF1322C6	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMLRWAH (SEC ID N° 153)
HAF1322C3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSLSMWRWAH (SEC ID N° 87)
HAF1322C4	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPAMWRWAH (SEC ID N° 154)
HAF1322C8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPSMWRWAH (SEC ID N° 147)
H10-03-6	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRHSARMWRWAH (SEC ID N° 155)
H10-03-6R	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRHSARMWRWAH (SEC ID N° 155)
H10-03-6Y	YLYGD (SEC ID N° 162)	VPRYSARMWRWAH (SEC ID N° 156)
ABEFs0101	YLSAD (SEC ID N° 163)	VARYSPSMWRWGH (SEC ID N° 135)
ABS0101G	YLSAD (SEC ID N° 163)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)

ABS0101P	YLSAD (SEC ID N° 163)	VPRYSASMWRWGH (SEC ID N° 136)
ABS0101PG	YLSAD (SEC ID N° 163)	VPRYSASMWRWAH (SEC ID N° 137)
EF3-1	YLHGD (SEC ID N° 161)	LPRYSPGMWRWAH (SEC ID N° 138)
EF3-2	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWNWAH (SEC ID N° 134)
EF3-3	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWGH (SEC ID N° 135)
EF3-4	YLHGD (SEC ID N° 161)	IPRWSQQMSRWAH (SEC ID N° 122)
EF3-6	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSQTMSRWAH (SEC ID N° 139)
EF3-7	YLHGD (SEC ID N° 161)	IARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 127)
EF3-8	YLHGD (SEC ID N° 161)	VAGYRPRRSGSSH (SEC ID N° 140)
EF3-9	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARHSANMLRWAH (SEC ID N° 141)
EF3-13	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSPSMWSWAH (SEC ID N° 142)
EF3-14	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYTPSMWRWAH (SEC ID N° 101)
EF3-15	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMFRWAH (SEC ID N° 143)
EF3-16	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMKSWAH (SEC ID N° 119)
EF3-17	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARHSRTMWRWGH (SEC ID N° 130)
EF3-18	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSMSRWAH (SEC ID N° 118)
EF3-20	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMLRWAH (SEC ID N° 144)
EF10-01	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPTMWRWAH (SEC ID N° 145)
EF10-02	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPSMWRWAH (SEC ID N° 106)
E-F10-03	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARWSPSMMRWAH (SEC ID N° 71)
EF10-04	YLHGD (SEC ID N° 161)	VTRWSPTMWRWAH (SEC ID N° 146)
EF10-07	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARNSPSMWRWAH (SEC ID N° 83)
EF10-08	YLHGD (SEC ID N° 161)	LARWSPSLSRWAH (SEC ID N° 105)
EF10-09	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARSSPSMWRWAH (SEC ID N° 147)
EF10-10	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSPRMWRWAH (SEC ID N° 157)
EF10-13	YLHGD (SEC ID N° 161)	VARYSRKMSSWGH (SEC ID N° 158)
EF10-14	YLHGD (SEC ID N° 161)	LASYSPSMWRWGH (SEC ID N° 159)
EF10-15	YLHGD (SEC ID N° 161)	IRSSVGSRRWWS (SEC ID N° 51)

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

Nombre del clon	Bucle AB AA143ff	Bucle CD AA169ff	Bucle EF AA198ff
H542-M3C8	LSLPC (SEC ID N° 164)	ISGPE (SEC ID N° 240)	PQTPPSQ (SEC ID N° 340)
H541-M2D7	REGGR (SEC ID N° 165)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
H541-M2E11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	DGRPE (SEC ID N° 242)	DKPFWGTSRWSR (SEC ID N° 55)
H541-M2D12	TKAFY (SEC ID N° 167)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H541-M2H10	TKGL_ (SEC ID N° 172)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H541-M2H8	TKAFY (SEC ID N° 167)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PPSPPT (SEC ID N° 341)
H542-M3A10	WWLFG (SEC ID N° 168)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3F10	IKKKK (SEC ID N° 169)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H542-M3D5	KWNKK (SEC ID N° 170)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRSRWRG (SEC ID N° 344)
H542-M4A4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRWKM (SEC ID N° 345)
H542-M3G11	YKTKD (SEC ID N° 173)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRYNPRMVRWAH (SEC ID N° 346)
H542-M3D9	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQSRWYN (SEC ID N° 347)
H542-M3F7	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H542-M4B12	RKEKK (SEC ID N° 174)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H542-M3D11	WWVGG (SEC ID N° 175)	DAGPE (SEC ID N° 243)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3A4	WWRGG (SEC ID N° 176)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWLQ (SEC ID N° 350)
H542-M3B8	WWRGG (SEC ID N° 176)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H542-M3C4	YGHKY (SEC ID N° 177)	NKQNH (SEC ID N° 244)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H542-M4D4	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEC ID N° 351)

H542-M3A7	TGGNK (SEC ID N° 179)	NMGPE (SEC ID N° 245)	NRSRWQQ (SEC ID N° 352)
H542-M3C12	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H542-M3E10	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKQLKK (SEC ID N° 354)
H542-M3E6	LDGDQ (SEC ID N° 180)	NGQPE (SEC ID N° 241)	QQKKRKKKK (SEC ID N° 355)
H542-M4E9	FIPHN (SEC ID N° 181)	DCGPE (SEC ID N° 246)	PPPLCAP (SEC ID N° 356)
H542-M4D8	KKKGK (SEC ID N° 182)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SLNRWKR (SEC ID N° 357)
H542-M4H8	KKKGK (SEC ID N° 182)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SLNRWKR (SEC ID N° 357)
H542-M4B11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KNKKKRK (SEC ID N° 358)
H542-M4C10	LTKNQ (SEC ID N° 166)	MDGPE (SEC ID N° 247)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H542-M4F11	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKMKK (SEC ID N° 360)
H542-M4C8	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H542-M4G2	KNKKK (SEC ID N° 183)	NGQPE (SEC ID N° 241)	REREWKR (SEC ID N° 362)
H542-M4C7	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEC ID N° 351)
H561G3M1B8	KKKNN (SEC ID N° 184)	YPEKH (SEC ID N° 248)	DKSRWQQ (SEC ID N° 363)
H542-M4D10	TKKET (SEC ID N° 178)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ELEGEEQ (SEC ID N° 351)
H542-M4B3	KKKKR (SEC ID N° 185)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PLRLPPM (SEC ID N° 364)
H542-M4A6	YGHKY (SEC ID N° 177)	NKQNH (SEC ID N° 244)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H561G3M1C6	LKKKT (SEC ID N° 186)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRSNWYGNRWRR (SEC ID N° 365)
H542-M4C1	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQSRWYN (SEC ID N° 347)
H542-M4F4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H561G3M1E1	TKGRW (SEC ID N° 187)	NGAPQ (SEC ID N° 249)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H542-M4F6	LSLPC (SEC ID N° 164)	ISGPE (SEC ID N° 240)	PQTPPSQ (SEC ID N° 340)
H561G3M1A1	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TPGNLAL (SEC ID N° 366)
H561G3M1A10	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SREDFRA (SEC ID N° 367)
H561G3M1A9	KHAET (SEC ID N° 189)	NGQPE (SEC ID N° 241)	LVSISVG (SEC ID N° 368)
H561G3M1B10	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H561G3M1G4	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H561G3M1B9	EGKRK (SEC ID N° 192)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1C1	RHGGW (SEC ID N° 193)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DLQDKKY (SEC ID N° 371)
H561G3M1C2	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	ISVPPDE (SEC ID N° 372)
H561G3M1H8	-KSGY (SEC ID N° 194)	RKKKE (SEC ID N° 251)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1C8	AKEGG (SEC ID N° 195)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TGPDITV (SEC ID N° 373)
H561G3M1D1	KYWMA (SEC ID N° 196)	NGQPE (SEC ID N° 241)	IVLSGFR (SEC ID N° 374)
H561G3M1D5	KKKNK (SEC ID N° 188)	DAGPE (SEC ID N° 243)	MGIHNIN (SEC ID N° 375)
H564G11M2F4	LTKNQ (SEC ID N° 166)	NGQPE (SEC ID N° 241)	MKQDEMA (SEC ID N° 376)
H561G3M1E2	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H561G3M1E6	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQWRLQW (SEC ID N° 377)
H561G3M1E7	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	HRRLVAR (SEC ID N° 378)
H561G3M1F10	QLRNK (SEC ID N° 197)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KQNLRRK (SEC ID N° 379)
H561G3M1F2	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H561G3M1G1	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	S RARWRH (SEC ID N° 343)
H564G11M2F12	KNHNT (SEC ID N° 199)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SRSRLHGNRWRR (SEC ID N° 380)
H561G3M1H3	KKKKK (SEC ID N° 171)	GNWQP (SEC ID N° 253)	NRERWRR (SEC ID N° 381)
H561G3M1H7	MSENE (SEC ID N° 200)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TWVRWMQ (SEC ID N° 382)
H564G11M2G2	KKKNK (SEC ID N° 188)	TTGPY (SEC ID N° 254)	PWSRWRL (SEC ID N° 348)
H564G11M2A10	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PHWQWKW (SEC ID N° 383)
H564G11M2A4	YGHKY (SEC ID N° 177)	DMNQP (SEC ID N° 255)	SKKKLRK (SEC ID N° 384)
H564G11M2A5	YGHKY (SEC ID N° 177)	KWPMF (SEC ID N° 256)	PWKRLRK (SEC ID N° 385)
H564G11M2A9	WWMDY (SEC ID N° 201)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2B1	YGHKY (SEC ID N° 177)	HDQRH (SEC ID N° 257)	TQKRWRS (SEC ID N° 386)

H564G11M2B12	MKKNK (SEC ID N° 202)	LGMYM (SEC ID N° 258)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2B3	YGHKY (SEC ID N° 177)	N KM FT (SEC ID N° 259)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H564G11M2B4	EYFRH (SEC ID N° 203)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TRRRWTR (SEC ID N° 388)
H564G11M2B5	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DHRRINR (SEC ID N° 389)
H564G11M2B7	FDMRD (SEC ID N° 204)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2C1	MKKPY (SEC ID N° 205)	LGYPE (SEC ID N° 260)	KKKKYHK (SEC ID N° 390)
H564G11M2C11	KKKNN (SEC ID N° 184)	HGYQL (SEC ID N° 261)	PWVRWMQ (SEC ID N° 342)
H564G11M2C3	YGHKY (SEC ID N° 177)	NVFIE (SEC ID N° 262)	QKKKLKK (SEC ID N° 391)
H564G11M2C7	FEMPY (SEC ID N° 206)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2C9	YGHKY (SEC ID N° 177)	NRGWH (SEC ID N° 263)	PQKKLRK (SEC ID N° 392)
H564G11M2D1	KKKNH (SEC ID N° 207)	PFTLK (SEC ID N° 264)	DKRGIRK (SEC ID N° 393)
H564G11M2D10	FFTYW (SEC ID N° 191)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRRRWTA (SEC ID N° 370)
H564G11M2D4	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H564G11M2D9	YGHKY (SEC ID N° 177)	STTRV (SEC ID N° 265)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2E10	KKKNH (SEC ID N° 207)	WDQHQ (SEC ID N° 266)	EKKRWKE (SEC ID N° 394)
H564G11M2E11	-KKKK (SEC ID N° 190)	DYGPM (SEC ID N° 250)	TSRRWRE (SEC ID N° 395)
H564G11M2E3	YGHKY (SEC ID N° 177)	SGWMM (SEC ID N° 267)	KKEKLRK (SEC ID N° 396)
H564G11M2E8	YGHKY (SEC ID N° 177)	WRKMT (SEC ID N° 268)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2H10	YGHKY (SEC ID N° 177)	FPKKY (SEC ID N° 269)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2F2	MWEPS (SEC ID N° 208)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H564G11M2F5	LRGST (SEC ID N° 209)	SPYFV (SEC ID N° 270)	KKKKIMK (SEC ID N° 398)
H564G11M2F6	KKKKK (SEC ID N° 171)	I RGTS (SEC ID N° 271)	DQTRWRR (SEC ID N° 399)
H564G11M2F7	DSYMI (SEC ID N° 210)	NGQPE (SEC ID N° 241)	TWVRWMQ (SEC ID N° 382)
H564G11M2F9	YGHKY (SEC ID N° 177)	QVPGW (SEC ID N° 272)	KKKEIKK (SEC ID N° 400)
H564G11M2G4	YGHKY (SEC ID N° 177)	DLPYQ (SEC ID N° 273)	KKNKLKK (SEC ID N° 401)
H564G11M2G6	YGHKY (SEC ID N° 177)	PRSHW (SEC ID N° 274)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2G7	KKKNK (SEC ID N° 188)	LYGHA (SEC ID N° 275)	NRERWRR (SEC ID N° 381)
H564G11M2G9	KKKNK (SEC ID N° 188)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWWQFRQ (SEC ID N° 402)
H564G11M2H2	YGHKY (SEC ID N° 177)	APYVH (SEC ID N° 276)	KKKEIKK (SEC ID N° 400)
H564G11M2H3	MEQHS (SEC ID N° 211)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H564G11M2H4	YGHKY (SEC ID N° 177)	RTGQK (SEC ID N° 277)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H564G11M2H8	YGHKY (SEC ID N° 177)	PTYWY (SEC ID N° 278)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H564G11M2H9	KKKKH (SEC ID N° 212)	EGMEI (SEC ID N° 279)	PSRRWRE (SEC ID N° 369)
H565_G12C1	LKKKT (SEC ID N° 186)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PRSNWYGNRWRR (SEC ID N° 365)
H565_G12D5	KKKKK (SEC ID N° 171)	PVVGA (SEC ID N° 280)	DQSKLSSLRWKK (SEC ID N° 403)
H565_G12E4	KKKKK (SEC ID N° 171)	PLMVD (SEC ID N° 281)	DQSKLSSLRWKK (SEC ID N° 403)
H565_G12A1	KKKNH (SEC ID N° 207)	KYGSQ (SEC ID N° 282)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C4	KKKNH (SEC ID N° 207)	RWNNQ (SEC ID N° 283)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12F1	KKKNH (SEC ID N° 207)	VYKQD (SEC ID N° 284)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A10	KKKNH (SEC ID N° 207)	NQMKF (SEC ID N° 285)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A8	KKKNH (SEC ID N° 207)	NHQHT (SEC ID N° 286)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A4	KKKNH (SEC ID N° 207)	KRFVD (SEC ID N° 287)	PNEKLKK (SEC ID N° 404)
H565_G12B2	KKKNH (SEC ID N° 207)	HHEPL (SEC ID N° 288)	PLSRWKR (SEC ID N° 405)
H565_G12F4	KKKNH (SEC ID N° 207)	PKMPY (SEC ID N° 289)	NRKHLRA (SEC ID N° 387)
H565_G12H5	KKKNH (SEC ID N° 207)	PKDHE (SEC ID N° 290)	ARSRWRK (SEC ID N° 408)
H565_G12G6	LTKNQ (SEC ID N° 166)	AKGSI (SEC ID N° 291)	PKKRLRR (SEC ID N° 409)
H565_G12A5	YGHKY (SEC ID N° 177)	EDPEM (SEC ID N° 292)	KNKKRKK (SEC ID N° 410)
H565_G12E9	YGHKY (SEC ID N° 177)	EFDHQ (SEC ID N° 293)	KNKKRKK (SEC ID N° 410)
H565_G12F8	YGHKY (SEC ID N° 177)	NEKQD (SEC ID N° 294)	NTKKLKK (SEC ID N° 411)
H565_G12D2	YGHKY (SEC ID N° 177)	APHYY (SEC ID N° 295)	NRKRIRK (SEC ID N° 412)

H565_G12F7	YGHKY (SEC ID N° 177)	PQLHL (SEC ID N° 296)	SRKRFRS (SEC ID N° 413)
H565_G12G2	YGHKY (SEC ID N° 177)	NWRAE (SEC ID N° 297)	ARSRWRK (SEC ID N° 408)
H565_G12H11	YGHKY (SEC ID N° 177)	NNQYK (SEC ID N° 298)	PFRRWVK (SEC ID N° 414)
H565_G12A7	YGHKY (SEC ID N° 177)	-RSIH (SEC ID N° 299)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A9	YGHKY (SEC ID N° 177)	RDRIM (SEC ID N° 300)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B3	YGHKY (SEC ID N° 177)	YGKGH (SEC ID N° 301)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B5	YGHKY (SEC ID N° 177)	GKGGK (SEC ID N° 302)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E3	YGHKY (SEC ID N° 177)	RHIGK (SEC ID N° 303)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E12	YGHKY (SEC ID N° 177)	QYTYH (SEC ID N° 304)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B1	YGHKY (SEC ID N° 177)	LHSHV (SEC ID N° 305)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12B11	YGHKY (SEC ID N° 177)	STTRV (SEC ID N° 265)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12D1	YGHKY (SEC ID N° 177)	ARDKR (SEC ID N° 306)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12E2	YGHKY (SEC ID N° 177)	EHKKT (SEC ID N° 307)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C5	KKKKK (SEC ID N° 171)	MDEVP (SEC ID N° 308)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C7	-KKKK (SEC ID N° 190)	QDWQR (SEC ID N° 309)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12G1	-KKKK (SEC ID N° 190)	PSDRE (SEC ID N° 310)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12G8	NKKKK (SEC ID N° 213)	QNTRW (SEC ID N° 311)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12C9	-KKKK (SEC ID N° 190)	DEGLH (SEC ID N° 312)	PQKRWRS (SEC ID N° 349)
H565_G12A11	IMNDW (SEC ID N° 214)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12D10	WTNGD (SEC ID N° 215)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12F6	WWHDM (SEC ID N° 216)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12B4	WENPH (SEC ID N° 217)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12H2	LYHEH (SEC ID N° 218)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12H8	GGDQH (SEC ID N° 219)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12C12	IYVPY (SEC ID N° 220)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12G10	FEMPY (SEC ID N° 206)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12C2	VVTSQ (SEC ID N° 221)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KRKKLKK (SEC ID N° 361)
H565_G12B6	WWNSK (SEC ID N° 222)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKQLKK (SEC ID N° 354)
H565_G12A12	MTGPG (SEC ID N° 223)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12D7	MWEPS (SEC ID N° 208)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12F3	DTYHD (SEC ID N° 224)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12F5	QDEKT (SEC ID N° 225)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12B12	GDHRI (SEC ID N° 226)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H565_G12D8	RNSNS (SEC ID N° 227)	NGQPE (SEC ID N° 241)	KKKKLKQ (SEC ID N° 353)
H565_G12D9	RENTM (SEC ID N° 228)	NGQPE (SEC ID N° 241)	NKKKKKK (SEC ID N° 415)
H565_G12H9	VNDKM (SEC ID N° 229)	NGQPE (SEC ID N° 241)	SKKKLRK (SEC ID N° 384)
H565_G12E1	RKKDE (SEC ID N° 230)	WPNME (SEC ID N° 313)	KKKKLKK (SEC ID N° 397)
H565_G12E8	SNSGY (SEC ID N° 231)	MDGPE (SEC ID N° 247)	KKKKIKK (SEC ID N° 359)
H565_G12G7	FEYRH (SEC ID N° 232)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PKKRLRR (SEC ID N° 409)
H565_G12E5	QRGRM (SEC ID N° 198)	KGGRE (SEC ID N° 252)	SRARWRH (SEC ID N° 343)
H565_G12A2	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	NGKRLHS (SEC ID N° 416)
H565_G12C8	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PKWLWHQ (SEC ID N° 417)
H565_G12E7	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWWKHHV (SEC ID N° 418)
H565_G12F12	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PNWKYQW (SEC ID N° 419)
H565_G12F10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PQRKVAP (SEC ID N° 420)
H565_G12G9	RKKKK (SEC ID N° 233)	NGQPE (SEC ID N° 241)	PWYKVLN (SEC ID N° 421)
H565_G12H10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRKWWTF (SEC ID N° 422)
H565_G12A3	KKKKK (SEC ID N° 171)	MTGRV (SEC ID N° 314)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12B8	KKKKK (SEC ID N° 171)	GKYNI (SEC ID N° 315)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12H4	KKKKK (SEC ID N° 171)	NAYLL (SEC ID N° 316)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12C10	KKKKK (SEC ID N° 171)	NGQPE (SEC ID N° 241)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12C6	KKKKK (SEC ID N° 171)	AQYNV (SEC ID N° 317)	DRERWRR (SEC ID N° 407)
H565_G12G11	KKKKK (SEC ID N° 171)	LYGHA (SEC ID N° 275)	NRERWRR (SEC ID N° 381)

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

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

- 5 Clones seleccionados como se ha descrito en lo que antecede con características como se ha descrito en lo que antecede se clonan en un vector de expresión en mamíferos tales como pCEP4 (Invitrogen). ADN plasmídico altamente purificado (Qiagen) se usó para transfectar transitoriamente células libres HEK293 con reactivo Freestyle™ MAX según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). El día 5 después de la transfección, los sobrenadantes se limpian de residuos celulares mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,2µm Stericup (Millipore). Como alternativa, las células libres HEK293 o células CHO con plásmidos de expresión que
- 10 contienen genes para la resistencia a antibióticos, tales como neomicina o puromicina. Las células transfectadas se cultivan en presencia de los antibióticos dando lugar a una supervivencia específica de clones de células que expresan de forma estable el gen de resistencia a antibióticos junto con el fragmento Fc específico de antígeno. Estos transfectantes estables segregan constantemente la proteína de interés durante períodos de tiempo largos. Los Fcab específicas de antígeno se purificaron a partir de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de
- 15 inmunoafinidad de la proteína A. Las Fcab unidas se eluyen de la proteína A lavando la columna con tampón glicina (pH=2,9-4,0), seguido de diálisis frente a PBS (pH = 6,8). La pureza de los Fcab se determina mediante análisis de SDS-PAGE no reductor y los potenciales agregados se detectan mediante HPLC de exclusión por tamaño usando una columna Zorbax GF250 y PBS como tampón de carrera.

- 20 Caracterización estructural de Fcab:

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

Unión específica de antígeno para Fcab:

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

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

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

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

Función efectora de Fcab específicos de antígeno (ADCC):

Con el fin de determinar si los Fcab específicos de Her2 median las funciones efectoras de Fc, se realizan ensayos de ADCC. En estos tipos de ensayos, los anticuerpos se unen a las células diana y se marcan para apoptosis en virtud de la unión a los receptores Fc sobre las células efectoras, tales como células asesinas naturales (NK). Las células SKBR3 (células diana) que están marcadas con el colorante fluorescente carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) se incuban con concentraciones crecientes de Fcab específicos de Her2 durante 20 minutos a 37 ° C. Las células NK sin tocar se aislaron a partir de sangre humana de donantes sanos por agotamiento negativo en un dispositivo de AutoMACS usando esferas magnéticas de MACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Las células NK purificadas se mezclan con las células SKBR3 opsonizadas en una proporción de

5:01 y se incuban durante 4 horas a 37 ° C. Después, se añade el colorante actinomicina 7-amino de fluorescencia (7-AAD), que tiñe específicamente las células apoptóticas. Las células apoptóticas SKBR3 se enumeran en el FACS como células dobles positivas a 7-AAD/CSFE. Los Fcab específicos de Her2 H10-03-6 y ABEFs0101 demostraron ser potentes mediadores de la muerte de las células SKBR3, con valores de CD_{50} de 1,1 nM y 1,0 nM, respectivamente. El mecanismo de la inducción de apoptosis es dependiente de la presencia de células NK que demuestra que los Fcab específicos de Her2 poseen funcionalidad de ADCC..

Ejemplo 7: Expresión en levaduras de Fab 4D5

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

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

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

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

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

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

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

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

La biblioteca se prepara y se selecciona siguiendo procedimientos convencionales.

Como ligando estructural se usa epítomos 4D5 y Her2neu diana de CR. Dichos miembros de la biblioteca se seleccionan para la producción de un anticuerpo modular citotóxico de acuerdo con la invención que tiene un sitio de unión modificado por ingeniería en el dominio CL, que es una unión específica a una molécula efectora, tal como un receptor Fc gamma. El Fab resultante se analiza para determinar su (i) unión a Her2neu con una $K_d < 10^{-8}$ M y una $CI_{50} < 10^{-8}$ M, y (ii) la función efectora, usando un ensayo de CDC y/o ADCC.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F-Star Biotechnologische Forschungs - und Entwicklungsges. M.B.H.

<120> Inmunoglobulina citotóxica

<130> SMW/CP6914931

<140> EP
<141> 03-03-2009

5 <150> EP 09737920.0
<151> 03-03-2009

<150> PCT/EP2009/052509
<151> 03-03-2009

10 <150> EP 08450068.5
<151> 02-05-2008

15 <160> 439
<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 232
20 <212> PRT
<213> humana

<400> 1

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
115 120 125

25

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
130 135 140

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

- 5 <210> 2
<211> 237
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> IgG humana que incluye modificaciones de aminoácidos aleatorizadas
- 10 <220>
<221> misc_feature
<222> (144)..(146)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (198)..(205)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (208)..(209)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- 25 <400> 2

Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	
1				5					10						15	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
		20						25					30			
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
		35						40					45			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
50						55					60					
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
65					70					75					80	
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	
				85					90					95		
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	
			100					105					110			
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	
		115					120					125				
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Xaa	
	130					135					140					
Xaa	Xaa	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
145					150					155					160	
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
				165					170					175		
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
			180					185					190			
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Trp	Xaa	
		195					200					205				
Xaa	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
	210					215					220					
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
225					230					235						

<211> 728
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de ADN para clonación de IgG modificada (secuencia diseñada)

<220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (438)..(439)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (441)..(442)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (444)..(445)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (600)..(601)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (603)..(604)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (606)..(607)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (609)..(610)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 45 <222> (612)..(613)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (615)..(616)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (618)..(619)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (621)..(622)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 65 <222> (630)..(631)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (633)..(634)
 <223> n es a, c, g o t

5

<400> 3

```

ccatggccga gcccaaattct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg      60
aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga      120
tctcccgga cctgaggtc acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg      180
tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg      240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact      300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg      360
agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc ctcgagaacc acaggtgtac accctgcccc      420
catcccgta cgagctcnns nnsnnscaag tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct      480
atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga      540
ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag cttaccgtgn      600
nnsnnsnnsn snnsnnsnns nnsaggtggn nsnnsaggaa cgtcttctca tgctccgtga      660
tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaag      720
cggccgca                                     728
    
```

10 <210> 4
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Cebador para PCR EPKSNCO

<400> 4
 ccatggccga gcccaaattct tgtgacaaaa ctc 33

20 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Cebador para PCR CH3LSAC

<400> 5
 agtcgagctc gtcacgggat gggggcaggg 30

30 <210> 6
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR CH3CSAC

40 <220>
 <221> misc_feature

<222> (11)..(12)
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> n es a, c, g o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

15 <400> 6
 gtacgagctc nnsnnsnsc aagtcagcct gacctgcctg g 41

20 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Cebador para PCR CH3CHIN
 <400> 7
 tgccaagctt gctgtagagg aagaaggagc cg 32

30 <210> 8
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Cebador para PCR CH3RHIN

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(18)
 <223> n es a, c, g o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g o t

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(24)
 <223> n es a, c, g o t

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g o t

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g o t

65 <400> 8
 tgccaagctt accgtgnnsn nsnsaggtg gnnsnnsagg aacgtcttct catgctcgg 59

<210> 9
 <211> 33

<212> ADN
<213> artificial

<220>

5 <223> Cebador para PCR CH3RNOT

<400> 9

agttgcggcc gctttaccog gagacagggg gag 33

10 <210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> Región de unión

<400> 10

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

Leu Asn Gly Ala Ala Thr Val Glu Ser
20 25

20

<210> 11

<211> 662

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de FcabRGD4L

30 <400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Ser Arg Trp Gln
 195 200 205
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 210 215 220
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Glu Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 245 250 255
 Gly Ala Ala Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu Asn
 260 265 270
 Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala
 275 280 285
 Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr
 290 295 300
 Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala
 305 310 315 320
 Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
 325 330 335

Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr
 340 345 350
 Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro
 355 360 365
 Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu
 370 375 380
 Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn
 385 390 395 400
 Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr
 405 410 415
 Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala
 420 425 430
 Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His
 435 440 445
 Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser
 450 455 460
 Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser
 485 490 495
 Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser
 500 505 510
 Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met
 515 520 525
 Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys
 530 535 540
 Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile
 545 550 555 560
 Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe
 565 570 575
 Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser
 580 585 590

Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser
595 600 605

Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe
610 615 620

Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe
625 630 635 640

Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn
645 650 655

Ile Leu His Lys Glu Ser
660

<210> 12
<211> 5200
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> vector pHENFcabRGD4

<400> 12

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatatt tatagggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
cttagacgtc aggtggcact ttctggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatatt 120
tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcgccott attccctttt 240
ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac 480
actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gaggataac actgcgcca 600
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccagccttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcgccacg ctccccaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg 1680
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1740
 atagtccgtg cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
 ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcaggt 1980
 cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
 cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
 acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
 cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
 accatgatta cgccaagctt aagcttgcat gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa 2280
 tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca 2340
 tggccgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgcca gcacctgaac 2400
 tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct 2460
 cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca 2520
 agttcaactg gtacgtggac ggctggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 2580
 agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc 2640
 tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga 2700
 aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat 2760
 cccgggatga gctgaccaag aaccaggctc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc 2820
 ccagcgacat cgcggtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca 2880

cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctt accgtggggt 2940
 gccgcgggtga ttgtctgagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc 3000
 atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagcgg 3060
 ccgcagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgg ggccgcatag actgttgaaa 3120
 gttgttttagc aaaacctcat acagaaaatt catttactaa cgtctggaaa gacgacaaaa 3180
 ctttagatcg ttacgctaac tatgagggct gtctgtggaa tgctacaggc gttgtggttt 3240
 gtactgggtga cgaaactcag tgttacggta catgggttcc tattgggctt gctatccctg 3300
 aaaatgaggg tggtggctct gaggggtggc gttctgaggg tggcggttct gaggggtggc 3360
 gtactaaacc tcctgagtag ggtgatacac ctattccggg ctatacttat atcaaccctc 3420
 tcgacggcac ttatccgctt ggtactgagc aaaacccgcg taatcctaatt ccttctcttg 3480
 aggagtctca gcctcttaatt actttcatgt ttcagaataa taggttccga aataggcagg 3540
 gtgcattaac tgtttatacg ggcactgtta ctcaaggcac tgaccccggt aaaacttatt 3600
 accagtacac tcctgtatca tcaaaagcca tgtatgacgc ttactggaac ggtaaattca 3660
 gagactgcgc tttccattct ggctttaatg aggatccatt cgtttgtgaa tatcaaggcc 3720
 aatcgtctga cctgcctcaa cctcctgtca atgctggcgg cggtctcgtt ggtggttctg 3780
 gtggcggctc tgagggtggc ggctctgagg gtggcggttc tgagggtggc ggctctgagg 3840
 gtggcgggtc cgggtggcggc tccggttccg gtgattttga ttatgaaaaa atggcaaacg 3900
 ctaataaggg ggctatgacc gaaaatgccg atgaaaacgc gctacagtct gacgctaaag 3960
 gcaaacttga ttctgtcgct actgattacg gtgctgctat cgatgggttc attggtgacg 4020
 tttccggcct tgctaattgt aatggtgcta ctggtgattt tgctggctct aattcccaaa 4080
 tggctcaagt cgggtgacgg gataattcac ctttaatgaa taatttcgt caatatattac 4140
 cttctttgcc tcagtcggtt gaatgtcgcc cttatgtctt tggcgctggt aaaccatatg 4200
 aattttctat tgattgtgac aaaataaact tattccgtgg tgtctttgcg tttcttttat 4260
 atgttgccac ctttatgtat gtattttcga cgtttgctaa catactgcat aaggagtctt 4320
 aataagaatt cactggcgtt cgttttacia cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc 4380
 caacttaatc gccttgacgc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc 4440
 cgcacccgat gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg cctgatgcgg 4500
 tattttctcc ttacgcatct gtgcgggtatt tcacaccgca cgtcaaagca accatagtag 4560
 ggcgcctgta gggcgccatt aagcgcgggc ggtgtggtgg ttaocgcgag cgtgaccgct 4620
 acaactgcca ggcgcctagc gcccgctcct ttcgctttct tcccttcctt tctcgccacg 4680
 ttgcgcgggt tccccgtca agctctaaat cggggggctcc ctttaggggt cggatttagt 4740

gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gatttgggtg atgggttcacg tagtgggcca 4800
 tcgccctgat agacgggtttt tcgccctttg acgttgaggt ccacgttctt taatagtga 4860
 ctcttggttc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg gctattcttt tgatttataa 4920
 gggattttgc cgatttcggc ctattgggtt aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac 4980
 gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca attttatggt gcaactctcag tacaatctgc 5040
 tctgatgcgc catagttaag ccagcccccga caccgcgcaa caccgcgtga cgcgcctga 5100
 cgggcttgtc tgctcccgcc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 5160
 atgtgtcaga ggttttcacc gtcctcaccg aaacgcgcga 5200

<210> 13
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> CH3rlink

<400> 13
 actagcggcc gcagagccac caccctcctt acccgagac agggagag 48

<210> 14
 <211> 5215
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> vector pHENFcabRGD4L

<400> 14

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tatagggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
 cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120
 tctaaatata ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgottcaat 180
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcctt attccctttt 240
 ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatogaact ggatctcaac agcggtaaga 360
 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg ogccgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtataac actgcggcca 600
 acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
 ttgcaggacc acttctgcgc tgggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
 gagccgggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 960
 ccogtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
 agatcogctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
 gctgcttgca aacaaaaaaa ccacogctac cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc 1320
 taccaaactct ttttcogaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtg gcogtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttacog 1500
 gggttgactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtccggctga acgggggggtt 1560
 cgtgcacaca gccacgcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg 1680
 gcagggctgg aacaggagag ogcacgaggg agcttccagg gggaaaogcc tggatatctt 1740
 atagtctgtt cgggttttgc caoctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggttc ctggcctttt 1860
 gctggccttt tgctcacatg ttctttctcg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
 ttacgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagcg aacgaccgag cgcagcaggt 1980
 cagttagoga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
 cgattcatta atgcagctgg caogacaggt ttcccactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
 acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
 oggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
 accatgatta cgccaagctt aagcttgcat gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa 2280
 tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt actcgcggcc cagccggcca 2340
 tggccgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac 2400
 tcctgggggg accgtcagtc ttctctctcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct 2460
 ccoggacccc tgaggtcaca tgctgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca 2520
 agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg 2580
 agcagtacaa cagcaogtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc 2640

tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	2700
aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	2760
cccgggatga	gctgaccaag	aaccaggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	2820
ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	2880
cgctcccggt	gctggactcc	gacggctcct	tcttctctta	cagcaagctt	accgtggggt	2940
gccgcggtga	ttgtctgagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	3000
atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaggagg	3060
gtggtggctc	tgcggccgca	gaacaaaaac	tcctctcaga	agaggatctg	aatggggccg	3120
catagactgt	tgaagttgt	ttagcaaaac	ctcatacaga	aaattcattt	actaacgtct	3180
ggaaagacga	caaaacttta	gatcggttacg	ctaactatga	gggctgtctg	tggaatgcta	3240
caggcggtgt	ggtttgtact	ggtgacgaaa	ctcagtgtta	cggtacatgg	gttctctattg	3300
ggcttgctat	ccctgaaaat	gagggtgggtg	gctctgaggg	tggcggttct	gagggtggcg	3360
gttctgaggg	tggcggtact	aaacctcctg	agtacggtga	tacacctatt	ccgggctata	3420
cttatatcaa	ccctctcgac	ggcacttata	cgctcggtac	tgagcaaaac	cccgctaata	3480
ctaactcttc	tcttgaggag	tctcagcctc	ttaatacttt	catgtttcag	aataataggt	3540
tccgaaatag	gcagggtgca	ttaactgttt	atacgggcac	tgttactcaa	ggcactgacc	3600
ccgttaaaac	ttattaccag	tacactcctg	tatcatcaaa	agccatgtat	gacgcttact	3660
ggaacggtaa	attcagagac	tgcgctttcc	attctggctt	taatgaggat	ccattcgttt	3720
gtgaatatca	aggccaatcg	tctgacctgc	ctcaacctcc	tgtcaatgct	ggcgggcggt	3780
ctggtgggtg	ttctgggtgc	ggctctgagg	gtggcggtc	tgagggtggc	ggttctgagg	3840
gtggcggtc	tgagggtggc	ggttccggtg	gcggctccgg	ttccggtgat	tttgattatg	3900
aaaaaatggc	aaacgcta	aagggggcta	tgaccgaaaa	tgccgatgaa	aacgcgctac	3960
agtctgacgc	taaaggcaaa	cttgattctg	tcgctactga	ttacgggtgct	gctatcgatg	4020
gtttcattgg	tgacgtttcc	ggccttgcta	atggtaatgg	tgtactgggt	gattttgctg	4080
gctctaattc	ccaaatggct	caagtgggtg	acggtgataa	ttcaccttta	atgaataatt	4140
tccgtcaata	tttaccttct	ttgcctcagt	cggttgaaat	tcgcccttat	gtctttggcg	4200
ctggtaaaac	atatgaattt	tctattgatt	gtgacaaaat	aaacttattc	cgtgggtgtct	4260
ttgcgtttct	tttatatgtt	gccaccttta	tgtatgtatt	ttcgacgttt	gctaacatac	4320
tgcataagga	gtcttaataa	gaattcactg	gccgtcgttt	tacaacgtcg	tgactgggaa	4380
aacctggcg	ttacccaact	taatcgctt	gcagcacatc	cccctttcgc	cagctggcgt	4440
aatagcgaag	aggcccgcac	cgatcgccct	tccaacagt	tgcgcagcct	gaatggcgaa	4500
tggcgctga	tgcggtattt	tctccttaag	catctgtgog	gtatttcaca	ccgcacgtca	4560

aagcaaccat agtacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtgggttacg 4620
 cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc ctacgcgccg ctcccttcgc tttcttccct 4680
 tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta 4740
 ggggtccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgattt gggatgatgt 4800
 tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg 4860
 ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctccggctat 4920
 tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt 4980
 taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttt atgggtgcact 5040
 ctcagtacaa tctgctctga tgcgcgatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc 5100
 gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc 5160
 gtctccggga gctgcatgtg tcagagggtt tcaccgtcat caccgaaacg cgcga 5215

<210> 15
 <211> 5013
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> vector pYDIdX

<400> 15

acggattaga agccgcgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60
 cctcgtcttc accggtcgcg ttctgaaac gcagatgtgc ctccgcgcgc actgctccga 120
 acaataaaga ttctacaata ctagctttta tgggtatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180
 ctggcccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga 240
 ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat 300
 taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc 360
 ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatat 420
 ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccgggatcgg actactagca gctgtaatac 480
 gactcactat agggaaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540
 tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt tttagcacag gaactgacaa 600
 ctatatgcga gcaaatcccc tcaccaactt tagaatcgac gcggtactct ttgtcaacga 660
 ctactatttt ggccaacggg aaggcaatgc aaggagtttt tgaatattac aaatcagtaa 720
 cgtttgtcag taattgcggt tctcaccctt caacaactag caaaggcagc ccataaaca 780
 cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtgggtgggtg tgggtctggt ggtgggtggt 840
 ctgggtgggtg tgggtctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtacg 900

acgatgacga taaggtacca ggatccagtg tgggtggaatt ctgcagatat ccagcacagt 960
ggcggccgct cgatcgagtc tagagggccc ttcgaaggta agcctatccc taaccctctc 1020
ctcgggtctcg attctacgcg taccggtcac catcaccatc accattgagt ttaaaccgcg 1080
tgatctgata acaacagtgt agatgtaaca aaatcgactt tgttcccact gtacttttag 1140
ctcgtacaaa atacaatata cttttcattt ctccgtaaac aacatgtttt cccatgtaat 1200
atccttttct atttttcgtt ccgttaccaa ctttacacat actttatata gctattcact 1260
tctatacact aaaaaactaa gacaatttta attttgctgc ctgccatatt tcaatttggt 1320
ataaattcct ataatttatc ctattagtag ctaaaaaag atgaatgtga atcgaatcct 1380
aagagaattg ggcaagtgc caaacaatac ttaaataaat actactcagt aataacctat 1440
ttcttagcat ttttgacgaa atttgctatt ttgtagagt cttttacacc atttgtctcc 1500
acacctccgc ttacatcaac accaataacg ccatttaac taagcgcac accaacattt 1560
tctggcgta gtccaccagc taacataaaa tgtaagctct cggggctctc ttgccttcca 1620
accagtcag aaatcgagtt ccaatccaaa agttcacctg tcccacctgc ttctgaatca 1680
aacaaggga taaacgaatg aggtttctgt gaagctgcac tgagtagtat gttgcagtct 1740
tttggaata cgagtctttt aataactggc aaaccgagga actcttggtt ttcttgccac 1800
gactcatctc cgtgcagttg gacgatatca atgccgtaac cattgaccag agccaaaaca 1860
tcctccttag gttgattacg aaacacgcca accaagtatt tcggagtgcc tgaactattt 1920
ttatatgctt ttacaagact tgaaattttc cttgcaataa ccgggtcaat tgttctcttt 1980
ctattgggca cacatataat accagcaag tcagcatcgg aatctagagc acattctgog 2040
gcctctgtgc tctgcaagcc gcaaactttc accaatggac cagaactacc tgtgaaatta 2100
ataacagaca tactccaagc tgcccttggtg tgcttaatca cgtatactca cgtgctcaat 2160
agtcaccaat gccctccctc ttggccctct ccttttcttt ttctgacga atttcttgaa 2220
gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggtaa tgtcatgata ataattggtt 2280
cttaggacgg atcgtctgcc tgtaacttac acgcgcctcg tatcttttaa tgatggaata 2340
atttggaat ttactctgtg tttatttatt tttatgtttt gtatttggtt tttagaaagt 2400
aaataaagaa ggtagaagag ttacggaatg aagaaaaaaa aataaacaaa ggtttaaaaa 2460
atttcaacaa aaagcgtact ttacatatat atttattaga caagaaaagc agattaaata 2520
gatatacatt cgattaacga taagtaaaat gtaaaatcac aggattttcg tgtgtggtct 2580
tctacacaga caagatgaaa caattcggca ttaatacctg agagcaggaa gagcaagata 2640
aaaggtagta tttgttggtg atccccctag agtcttttac atcttcggaa aacaaaaact 2700
attttttctt taatttcttt ttttactttc tatttttaat ttatatattt atattaaaaa 2760
atttaatta taattatttt tatagcacgt gatgaaaag acccaggtgg cacttttcgg 2820

ggaaatgtgc goggaaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 2880
 ctcatgagac aataaacctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 2940
 attcaacatt tccgtgtcgc cettattccc ttttttgccg cattttgcct tccgtttttt 3000
 gctcaccocag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 3060
 ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa 3120
 cgttttocaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtgt 3180
 gacgccgggc aagagcaact cggctgcgcg atacactatt ctcagaatga cttgggtgag 3240
 tactcaocag tcacagaaaa gcatottacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 3300
 gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga 3360
 ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggata atgtaactcg ccttgatcgt 3420
 tgggaacogg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 3480
 gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaa acttactct agcttcccgg 3540
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 3600
 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgggt 3660
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctccgta tcgtagtatt ctacacgacg 3720
 ggcagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 3780
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa 3840
 cttcattttt aattttaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaa 3900
 atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 3960
 tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 4020
 ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 4080
 ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 4140
 cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaactct gttaccagtg 4200
 gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttg actcaagacg atagttaccg 4260
 gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 4320
 acgacctaca cgaactgag atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 4380
 gaaggagaaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 4440
 agggagcttc caggggggaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 4500
 tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc cgagcctatg gaaaaacgcc 4560
 agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttgcggc cttttgctca catgttcttt 4620
 cctgcgttat cccctgatcc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 4680

ES 2 683 847 T3

```

gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc 4740
ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcggt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac 4800
aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttacctcact 4860
cattaggcac ccagggtttt acactttatg cttccggctc ctatgttggtg tggaattgtg 4920
agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgcaa gctcggaatt 4980
aaccctcact aaagggaaca aaagctggct agt 5013

```

<210> 16
 <211> 5971
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> vector pYD1dXFc

<400> 16

acggattaga agccgccgag cgggtgacag cctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctccgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggcccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accacttta ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt	540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgta ttgcttcagt ttagcacag gaactgacaa	600
ctatatgcga gcaaatcccc tcaccaactt tagaatcgac gcgtaactct ttgtcaacga	660
ctactatttt ggccaacggg aaggcaatgc aaggagtttt tgaatattac aaatcagtaa	720
cgtttgtcag taattgcggt tctcaccct caacaactag caaaggcagc ccataaaca	780
cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt	840
ctggtggtgg tggttctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtacg	900
acgatgacga taaggtagca ggatccgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccctctgg	960
ccccagctc caagagcacc tcgggcggca ccgcgcctt gggctgctg gtgaaggatt	1020
acttcccaga gcccgtagcc gtgagctgga acagcggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca	1080
cctttccgc cgtgctgcag tccagcggcc tgtactcct gagcagcgtg gtgaccgtgc	1140
ccagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaatgt gaaccacaag ccagcaata	1200
ccaaggtgga taagaagggt gagcccaaga gcagcgacaa gacacacacg tgtcccccat	1260

gtcccgcccc tgagctgctg ggcggccctt cctgtttcct gttccctccc aagccaaagg 1320
 aacccctgat gatctcccg acccctgagg tgacctgtgt ggtggtggac gtgagccacg 1380
 aggaccacaga ggtgaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaga 1440
 ccaagcctag agaggagcag tacaacagca cctaccgcgt ggtgagcgtg ctgaccgtgc 1500
 tgcaccagga ttggtgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgagcaac aaggccctgc 1560
 ctgcccccat cgagaagacc atctccaagg ccaagggcca gcctcgagaa ccacaggtgt 1620
 aacccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg 1680
 tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga 1740
 acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccctcttc ctctacagca 1800
 agctcaaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc 1860
 atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaagtag 1920
 cggccgctcg atcgagtcta gagggccctt cgaaggtaag cctatcccta accctctcct 1980
 cgggtctgat tctacggta cgggtcatca tcaccatcac cattgagttt aaaccgcgtg 2040
 atctgataac aacagtgtag atgtaacaaa atcgactttg ttcccactgt acttttagct 2100
 cgtacaaaat acaatatact tttcatttct ccgtaacaa catgttttcc catgtaatat 2160
 ccttttctat ttttcgttcc gttaccaact ttacacatac tttatatagc tattcacttc 2220
 tatacactaa aaaactaaga caattttaat tttgctgctt gccatatttc aatttgttat 2280
 aaattcctat aatttatcct attagtagct aaaaaagat gaatgtgaat cgaatcctaa 2340
 gagaattggg caagtgcaca aacaatactt aaataaatac tactcagtaa taacctattt 2400
 cttagcattt ttgacgaaat ttgctatttt gttagagtct ttacaccat ttgtctccac 2460
 acctccgctt acatcaacac caataacgcc atttaatcta agcgcatcac caacattttc 2520
 tggcgctcagt ccaccagcta acataaaatg taagctctcg gggctctctt gccttccaac 2580
 ccagtcagaa atcgagttcc aatccaaaag ttcacctgtc ccacctgctt ctgaatcaaa 2640
 caagggaata aacgaatgag gtttctgtga agctgcactg agtagtatgt tgcagtcttt 2700
 tggaaatacg agtcttttaa taactggcaa accgaggaac tcttggtatt cttgccacga 2760
 ctcatctccg tgcagttgga cgatatcaat gccgtaatca ttgaccagag ccaaaacatc 2820
 ctcccttaggt tgattacgaa acacgccaac caagtatttc ggagtgcctg aactattttt 2880
 atatgctttt acaagacttg aaattttcct tgcaataacc gggtoaattg ttctctttct 2940
 attgggcaca catataatac ccagcaagtc agcatcgga tctagagcac attctgcggc 3000
 ctctgtgtct tgcaagccgc aaactttcac caatggacca gaactacctg tgaaattaat 3060
 aacagacata ctccaagctg cctttgtgtg cttaatcacg tatactcacg tgctcaatag 3120

tcaccaatgc	cctccctctt	ggccctctcc	ttttcttttt	tcgaccgaat	ttcttgaaga	3180
cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcattgataat	aatgggtttct	3240
taggacggat	cgcttgccctg	taacttacac	gcgcctcgta	tcttttaatg	atggaataat	3300
ttgggaattt	actctgtgtt	tattttattt	tatgttttgt	atgttgattt	tagaaagtaa	3360
ataaagaagg	tagaagagtt	acggaatgaa	gaaaaaaaa	taaacaaagg	tttaaaaaat	3420
ttcaacaaaa	agcgtacttt	acatatatat	ttattagaca	agaaaagcag	attaaataga	3480
tatacattcg	attaacgata	agtaaaatgt	aaaatcacag	gatttttcgtg	tgtgggtcttc	3540
tacacagaca	agatgaaaca	attcggcatt	aatacctgag	agcaggaaga	gcaagataaa	3600
aggtagtatt	tgttggcgat	ccccctagag	tcttttacat	cttcggaaaa	caaaaactat	3660
tttttcttta	atttcttttt	ttactttcta	tttttaattt	atatatttat	attaaaaaat	3720
ttaaattata	attattttta	tagcacgtga	tgaaaaggac	ccaggtggca	cttttcgggg	3780
aaatgtgcgc	ggaaccctta	tttgttttatt	tttctaata	cattcaaata	tgtatccgct	3840
catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	gtatgagtat	3900
tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	3960
tcaccagaaa	acgctgggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggg	4020
ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gacccctgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	4080
ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	cccggtgtga	4140
cgccggggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcct	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	4200
ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	4260
tgccataacc	atgagtata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	tccgaggacc	4320
gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcgttg	4380
ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgccctgtagc	4440
aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tggcgaacta	cttactctag	cttcccggca	4500
acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcggccct	4560
tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggg	gagcgtgggt	ctcgcggtat	4620
cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgtatc	gtagttatct	acacgacggg	4680
cagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggt	cctcactgat	4740
taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	atttaaaact	4800
tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	gacccctttt	gataatctca	tgacccaaat	4860
cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	4920
ttcttgagat	cctttttttc	tgcgcgtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	4980
accagcgggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	5040

cttcagcaga ggcgagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca 5100
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 5160
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 5220
taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 5280
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttccgga 5340
agggagaaaag ggcgacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 5400
ggagcttcca ggggggaacg cctggatatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg 5460
acttgagcgt cgatttttct gatgctcgtc agggggggccg agcctatgga aaaacgccag 5520
caacgcggcc tttttacggt tcttgccctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 5580
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 5640
tcgcccagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgage gaggaagcgg aagagcgccc 5700
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 5760
gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgage caacgcaatt aatgtgagtt acctcactca 5820
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcct atgttgtgtg gaattgtgag 5880
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc tcggaattaa 5940
ccctcactaa agggaacaaa agctggctag t 5971

<210> 17
<211> 5657
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> pYD1CH12
<400> 17

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60
cctcgtcttc accggctcgg ttctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgccg actgctccga 120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaataat tggcagtaac 180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgoga 240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagoga agogatgatt tttgatctat 300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc 360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac 420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccgggatcgg actactagca gctgtaatac 480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540
tacttcgctg tttttcaata tttctgttta ttgottcagt tttagcacag gaactgacaa 600

ctatatgoga gcaaatcccc tcaccaactt tagaatcgac gccgtactct ttgtcaacga	660
ctactatfff ggccaacggg aaggcaatgc aaggagtttt tgaatattac aaatcagtaa	720
cgtttgtcag taattgcggt tctcaccct caacaactag caaaggcagc cccataaaca	780
cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtgggtgggg tggttctggg ggtgggtggg	840
ctgggtgggg tggttctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtacg	900
acgatgacga taaggtagca ggatccgcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccctctgg	960
ccccagctc caagagcacc tccggcggca ccgcccctt gggctgcctg gtgaaggatt	1020
acttcccaga gcccgtgacc gtgagctgga acagcggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca	1080
cctttcccgc cgtgctgcag tccagcggcc tgtactcctt gagcagcgtg gtgaccgtgc	1140
ccagcagcag cctgggcacc cagacctaca tctgcaatgt gaaccacaag cccagcaata	1200
ccaaggtgga taagaagggt gagcccaaga gcagcgacaa gacacacacg tgtcccccat	1260
gtcccgcctt tgagctgctg ggcggccctt ccgtgttctt gttccctccc aagccaaagg	1320
acacccctgat gatctccgg acccctgagg tgacctgtgt ggtgggtggg gtgagccacg	1380
aggaccacga ggtgaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcac aacgccaaaga	1440
ccaagcctag agaggagcag tacaacagca cctaccgctt ggtgagcgtg ctgaccgtgc	1500
tgcaaccagga ttggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgagcaac aaggccctgc	1560
ctgcccccat cgagaagacc atctccaagg ccaagggcca gcctcgaggc cgctcgatcg	1620
agtctagagg gcccttcgaa ggtaagcta tccctaacc tctcctcggt ctcgattcta	1680
cgcgtaacgg tcatcatcac catcaccatt gagtttaaac ccgctgatct gataacaaca	1740
gtgtagatgt aacaaaatcg actttgttcc cactgtactt ttagctcgta caaaatacaa	1800
tatacttttc atttctccgt aaacaacatg ttttcccatg taatatcctt ttctatffff	1860
cgttcogtta ccaactttac acatacttta tatagctatt cacttctata cactaaaaaa	1920
ctaagacaat ttttaattttg ctgcctgcc aattttcaatt tgttataaat tcctataatt	1980
tatcctatta gtagctaaaa aaagatgaat gtgaatcgaa tcctaagaga attgggcaag	2040
tgacacaaaca atacttaaat aaatactact cagtaataac ctattttcta gcatttttga	2100
cgaaatttgc tattttgtta gagtctttta caccatttgt ctccacacct ccgcttacct	2160
caacaccaat aacgccattt aatctaagcg catcaccaac attttctggc gtcagtccac	2220
cagctaacat aaaatgtaag ctctcggggc tctcttgctt tccaaccacg tcagaaatcg	2280
agttccaatc caaaagttca cctgtccac ctgcttctga atcaacaag ggaataaacg	2340
aatgaggttt ctgtgaagct gcaactgagta gtatgttgca gtcttttggg aatacgagtc	2400
ttttaataac tggcaaaccg aggaactctt ggtattcttg ccacgactca tctccgtgca	2460
gttggacgat atcaatgccg taatcattga ccagagccaa aacatcctcc ttaggttgat	2520

taogaaacac gccaaccaag tatttcggag tgcctgaact atttttatat gcttttacaa	2580
gacttgaaat tttccttgca ataaccgggt caattgttct ctttctattg ggcacacata	2640
taatacccag caagtcagca tcggaatcta gagcacattc tgcggcctct gtgctctgca	2700
agcogcaaac tttcaccaat ggaccagaac tacctgtgaa attaataaca gacatactcc	2760
aagotgocct tgtgtgttta atcacgtata ctcacgtgct caatagtcac caatgcocctc	2820
cctcttggcc ctctcctttt ctttttttoga ccgaatttct tgaagacgaa agggcctcgt	2880
gatacgocct tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttagg acggatcgct	2940
tgcctgtaac ttacacgggc ctcgatatct ttaatgatgg aataatttgg gaatttactc	3000
tgtgttttatt tatttttatg ttttgtatct ggattttaga aagtaaataa agaaggtaga	3060
agagttacgg aatgaagaaa aaaaaataaa caaagggtta aaaaatttca acaaaaagcg	3120
tactttacat atatatttat tagacaagaa aagcagatta aatagatata cattcgatta	3180
acgataagta aaatgtaaaa tcacaggatt ttcgtgtgtg gtcttctaca cagacaagat	3240
gaaacaattc ggcattaata cctgagagca ggaagagcaa gataaaaggt agtatttgtt	3300
ggcgatcccc ctagagtctt ttacatcttc ggaaaacaaa aactattttt tctttaattt	3360
ctttttttac tttctatttt taatttatat atttatatta aaaaatttaa attataatta	3420
tttttatagc acgtgatgaa aaggaccag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa	3480
ccoctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac	3540
cctgataaat gottcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg	3600
tggccottat tccctttttt ggggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc	3660
tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg	3720
atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttgcgccga agaacgtttt ccaatgatga	3780
gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcg tattatcccg tgttgacgcc gggcaagagc	3840
aaactggctg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag	3900
aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga	3960
gtgataaacac tgoggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg	4020
cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga	4080
atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt	4140
tggcgaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact	4200
ggatggaggg ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttcct gctggctggg	4260
ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg	4320
ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacgggcagt caggcaacta	4380

tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 4440
 tgtcagaacca agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta 4500
 aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt 4560
 ttttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt 4620
 tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt 4680
 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc 4740
 agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg 4800
 tagcaaccgc tacatacctc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg 4860
 ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg 4920
 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac 4980
 tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg 5040
 acaggatatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg 5100
 ggaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat 5160
 ttttgtgatg ctcgtcaggg gggccgagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt 5220
 tacggttctt ggctttttgc tggccttttg ctcacatgtt ctttcctgcg ttatccctg 5280
 attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa 5340
 cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc 5400
 ctctccccgc gcgttggccg attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga 5460
 aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct cactcattag gcaccccagg 5520
 ctttacactt tatgcttcog gctcctatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc 5580
 acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcgg aattaaccct cactaaaggg 5640
 aacaaaagct ggctagt 5657

<210> 18
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Fcab01

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (449)..(450)
 <223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (452)..(453)
 <223> n es a, c, g o t

5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (455)..(456)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (611)..(612)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (614)..(615)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (617)..(618)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (620)..(621)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (623)..(624)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (626)..(627)
 <223> n es a, c, g o t
 40
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (629)..(630)
 <223> n es a, c, g o t
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (632)..(633)
 <223> n es a, c, g o t
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (641)..(642)
 <223> n es a, c, g o t
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (644)..(645)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 18

```

ggcccagccg gccatggccg agcccaaata ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg      60
cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc ttccccccaa aaccaagga    120
caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgctgt gtggtggacg tgagccacga    180
agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac    240
aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct    300
gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc    360
agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag cctcgagaac cacaggtgta    420
caccctgccc ccatcccggg atgaactgnn bnnbnnbcag gtcagcctga cctgcctggt    480
caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa    540
caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc totacagcaa    600
gctcaccgtg nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn bnnbaggtgg nnnnnbggga acgtcttctc    660
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc    720
tccgggtaaa gcggccgc                                     738

```

<210> 19
 <211> 738
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Fcab02

<400> 19

```

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

```

<210> 20
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Fcab03
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (449)..(450)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (452)..(453)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (455)..(456)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (617)..(618)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (620)..(621)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (623)..(624)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (626)..(627)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (629)..(630)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (632)..(633)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 55 <221> misc_feature
 <222> (635)..(636)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 60 <221> misc_feature
 <222> (638)..(639)
 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (653)..(654)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (656)..(657)

<223> n es a, c, g o t

<400> 20

```

ggcccagccg gccatggccg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg      60
cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttcccccaa aaccaagga      120
caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga      180
agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac      240
aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct      300
gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc      360
agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag cctcgagaac cacaggtgta      420
caccctgccc ccttcccggg atgagctgnn bnnbnnbcag gtcagcctga cctgcctggt      480
caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa      540
caactacaag accacgcctc cagtgtctga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa      600
gtcaccgtg ggttctnnbn nbnnbnnbnn bnnbnnbnnb agcggcaggt ggnnbnnbgg      660
gaacgtcttc tcatgctcgg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag      720
cctctccctg tctccgggta aagcggccgc      750

```

10

<210> 21

<211> 750

<212> ADN

15 <213> artificial

<220>

<223> Fcab04

20 <400> 21

ggcccagccg gccatggccg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg 60
cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctct tccccccaa aaccaagga 120
caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga 180
agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac 240
aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcacogtcc 300
gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagcctccc 360
agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag cctcgagaac cacaggtgta 420
caccctgcc ccctctcggg atgagctgkm tkmtkmtcag gtcagcctga cctgcctggt 480
caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa 540
caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tctttcttcc tctacagcaa 600
gtcacccgtg ggttctkmtk mtkmtkmtkm tkmtkmtkmt agcggcaggt ggkmtkmtgg 660
gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 720
cctctccctg tctccgggta aagcggccgc 750

- 5 <210> 22
<211> 738
<212> ADN
<213> artificial
- 10 <220>
<223> Fcab05
- 15 <220>
<221> misc_feature
<222> (449)..(450)
<223> n es a, c, g o t
- 20 <220>
<221> misc_feature
<222> (452)..(453)
<223> n es a, c, g o t
- 25 <220>
<221> misc_feature
<222> (455)..(456)
<223> n es a, c, g o t
- 30 <220>
<221> misc_feature
<222> (611)..(612)
<223> n es a, c, g o t
- 35 <220>
<221> misc_feature
<222> (614)..(615)
<223> n es a, c, g o t
- 40 <220>
<221> misc_feature
<222> (617)..(618)
<223> n es a, c, g o t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (620)..(621)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (623)..(624)
 <223> n es a, c, g o t
 10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (626)..(627)
 <223> n es a, c, g o t
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (629)..(630)
 <223> n es a, c, g o t
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (632)..(633)
 <223> n es a, c, g o t
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (641)..(642)
 <223> n es a, c, g o t
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (644)..(645)
 <223> n es a, c, g o t
 35
 <400> 22

 ggcccagccg gccatggccg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg 60
 ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga 120
 caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga 180
 agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaaagac 240
 aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct 300
 gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc 360
 agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag cctcgagaac cacaggtgta 420
 caccctgcc ccattccgtg atgagkmtnn bnnbnnbkmt gtcagcctga cctgcctggt 480
 caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa 540
 caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa 600
 gctcaccgtg nnnnnnnnn nnnnnnnnn bnnbaggtgg nnnnnbggga acgtcttctc 660
 atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc 720
 tccgggtaaa ggggcgc 738
 40 <210> 23

<211> 738
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> Fcab06

<400> 23

```

ggccccagccg gccatggccg agcccaaadc ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg      60
cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc tccccccaa aacccaagga    120
caccctcatg atctcccggg cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga    180
agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaaagac    240
aaagccgcggg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct    300

gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc    360
agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag cctcgagaac cacaggtgta    420
caccctgccc ccaccccggg acgagkmtkm tkmtkmtkmt gtcagcctga cctgcctggt    480
caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa    540
caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgaaggc tcctttcttc tctacagcaa    600
gtcaccgtg kmtkmtkmtk mtkmtkmtkm tkmtagggtg kmtkmtggga acgtcttctc    660
atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc    720
tccgggtaaa gcggccgc                                     738

```

10

15 <210> 24
<211> 85
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador para PCR gapch35

20 <400> 24

```

caacaaggcc ctgcctgcc ccacgagaa gaccatctcc aaggccaagg gccagcctcg      60
agaaccacag gtgtacacc tgccc                                     85

```

25 <210> 25
<211> 99
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> Cebador para PCR gapfcs3

<400> 25

	gagaccgagg agaggggttag ggataggctt accttcgaag ggccctctag actcgatcga	60
	gcggcccgctc atttaccgg agacagggag aggctcttc	99
5	<210> 26 <211> 79 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> Cebador Abmut	
15	<220> <221> misc_feature <222> (43)..(44) <223> n es a, c, g o t	
20	<220> <221> misc_feature <222> (46)..(47) <223> n es a, c, g o t	
25	<220> <221> misc_feature <222> (49)..(50) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 26	
	gaaccacagg tgtacacct gcccccatcc cgggatgagc tgnnbnnbnn bcaggtcagc	60
	ctgaacctgcc tgggtcaaag	79
30	<210> 27 <211> 79 <212> ADN <213> artificial	
35	<220> <223> Cebador Abmut2LR	
40	<220> <221> misc_feature <222> (40)..(41) <223> n es a, c, g o t	
45	<220> <221> misc_feature <222> (43)..(44) <223> n es a, c, g o t	
50	<220> <221> misc_feature <222> (46)..(47) <223> n es a, c, g o t	
55	<220> <221> misc_feature <222> (49)..(50) <223> n es a, c, g o t	
60	<220> <221> misc_feature <222> (52)..(53)	

<223> n es a, c, g o t

<400> 27

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagn nbnnbnnbnn bnnbgtcagc 60

ctgacctgcc tgggtcaaag 79

5

<210> 28

<211> 79

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> Cebador Abmut1L

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(41)

<223> n es a, c, g o t

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(44)

<223> n es a, c, g o t

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(47)

<223> n es a, c, g o t

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n es a, c, g o t

35

<400> 28

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagn nbnnbnnbnn bcaggtcagc 60

ctgacctgcc tgggtcaaag 79

40

<210> 29

<211> 79

<212> ADN

<213> artificial

<220>

45 <223> Cebador Abmut1R

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(44)

50 <223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)..(47)

55 <223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(50)
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>
 <221> misc feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n es a, c, g o t

10 <400> 29

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgnnbnnbnn bnnbgtcagc 60
ctgacctgcc tgggtcaaag 79

15 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 <400> 30

Leu Asp Asn Ser Gln
1 5

25 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 <400> 31

Tyr Glu Gly Ser Ser
1 5

35 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

45 <400> 32

Tyr Met Ser Ala Asp
1 5

50 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 <400> 33

		Tyr Arg Arg Gly Asp
		1 5
5	<210> 34	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 34	
		Leu Met Ser Arg Gln
		1 5
15	<210> 35	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 35	
25		Leu His Leu Ala Gln
		1 5
	<210> 36	
	<211> 5	
30	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
35	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 36	
		Tyr Leu Ser Lys Asp
		1 5
40	<210> 37	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 37	
		Tyr Arg Ser Gly Ser
		1 5
50	<210> 38	
	<211> 5	
	<212> PRT	
55	<213> artificial	

	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
5	<400> 38	
		Leu Arg Asp Gly Gln
		1 5
	<210> 39	
10	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 39	
		Tyr Ser Ala Asn Thr
		1 5
20	<210> 40	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 40	
		Tyr Ala Ser Asn Thr
30		1 5
	<210> 41	
	<211> 5	
35	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
40	<400> 41	
		Tyr Ser Asp Gly Asp
		1 5
45	<210> 42	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
50	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 42	
		Tyr Ser Gly Gly Ser
55		1 5
	<210> 43	
	<211> 5	

	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 43	
		Tyr Gly Arg Asp Ser
		1 5
10	<210> 44	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 44	
20		Tyr Ala Gly Gly Thr
		1 5
	<210> 45	
	<211> 5	
25	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
30	<400> 45	
		Tyr Ser Ser Asp Ser
		1 5
35	<210> 46	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 46	
		Tyr His Ser Gly Ser
		1 5
45	<210> 47	
	<211> 5	
	<212> PRT	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
55	<400> 47	

		Tyr Leu Thr Asn Ser
		1 5
5	<210> 48	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 48	
		Tyr Gly Ser Glu Glu
		1 5
15	<210> 49	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 49	
		Tyr Arg Ser Gly Glu
		1 5
25	<210> 50	
	<211> 5	
	<212> PRT	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
35	<400> 50	
		Tyr Gly Thr Asp Asp
		1 5
40	<210> 51	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 51	
		Ile Arg Ser Ser Val Gly Ser Arg Arg Trp Trp Ser
		1 5 10
50	<210> 52	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	

<400> 52

Ala Arg Tyr Ser Pro Arg Met Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

5

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

10

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 53

15

Ser Arg Arg Asp Ser Ser Leu Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

<210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

20

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

25

<400> 54

Ala Pro Gly Ser Lys Gly Tyr Arg Arg Trp Ala Leu
1 5 10

30

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

35

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 55

Asp Lys Pro Phe Trp Gly Thr Ser Arg Trp Ser Arg
1 5 10

40

<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> artificial

45

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 56

50

Ser Ile Asn Asp Leu Ile Asn His Arg Trp Pro Tyr
1 5 10

55

<210> 57
<211> 12
<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

5

<400> 57

Met	Trp	Gly	Ser	Arg	Asp	Tyr	Trp	Arg	Trp	Ser	His
1				5					10		

10

<210> 58

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 58

Asn	Ser	Gly	Ser	Ala	Met	Met	Val	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10		

20

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

25

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30

<400> 59

Gln	Arg	Ser	Arg	Leu	Ser	Arg	Gln	Arg	Trp	Trp	Arg
1				5					10		

35

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

40

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 60

Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Arg	Met	Leu	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10		

45

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 61

55

ES 2 683 847 T3

Val Ser Arg Tyr Ser Met Thr Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

5 <210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff
<400> 62

Val Pro Arg Tyr Ser Arg Ser Met Met Arg Trp Ala His
1 5 10

15 <210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff
<400> 63

Val Pro Arg Tyr Ser Gln Met Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

25 <210> 64
<211> 13
<212> PRT
30 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff
35 <400> 64

Ile Thr Arg Tyr Ser Arg Gln Met Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

40 <210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff
<400> 65

Val Pro Arg Tyr Ser Ala Leu Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

50 <210> 66
<211> 13
<212> PRT
55 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 66

	Val	Ala	Arg	His	Ser	Glu	Ala	Met	Trp	Lys	Trp	Gly	His
5	1				5					10			

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 67

	Val	Gly	Arg	Tyr	Ser	Gln	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

<210> 68

20 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 68

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

30 <210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 69

40

	Val	Gly	Arg	His	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Lys	Trp	Ala	His
	1				5					10			

<210> 70

<211> 13

45 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 70

	Leu	Gly	Arg	Trp	Ser	Pro	Lys	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

55 <210> 71

<211> 13

<212> PRT
 <213> artificial

<220>

5 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 71

Val Ala Arg Trp Ser Pro Ser Met Met Arg Trp Ala His
 1 5 10

10

<210> 72
 <211> 5009
 <212> ADN
 <213> artificial

15

<220>
 <223> vector pYD1

<400> 72

20

```

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagaactct ctccgtgcgt      60
cctcgtcttc accggtcgcg ttctgaaac gcagatgtgc ctccgccgcg actgctccga      120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac      180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga      240
ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcagtgatt tttgatctat      300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttta ctaatacttt caacatTTTc      360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca aaaaaaatt gttaatatac      420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccggatcgg actactagca gctgtaatac      480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt      540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgta ttgcttcagt tttagcacag gaactgacaa      600
ctatatgcga gcaaattccc tcaccaactt tagaatcgac gccgtactct ttgtcaacga      660
ctactatTTT ggccaacggg aaggcaatgc aaggagTTTT tgaatattac aaatcagtaa      720
cgTTTgtcag taattgcggt tctcaccct caacaactag caaaggcagc occataaaca      780
cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt      840
ctggtggtgg tggttctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtacg      900
acgatgacga taaggtacca ggatccagtg tggtggaatt ctgcagatat ccagcacagt      960
ggcggccgct cgagtctaga gggcccttcg aaggtaagcc tatccctaac cctctcctcg     1020
gtctcgattc tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttgagtttaa acccgctgat     1080

```

ctgataacaa	cagtgtagat	gtaacaaaat	cgactttggt	ccactgtac	ttttagctcg	1140
tacaaaatac	aatatacttt	tcattttctcc	gtaaacaaca	tgttttccca	tgtaatatcc	1200
ttttctat	ttcgttccgt	taccaacttt	acacatactt	tatatagcta	ttcacttcta	1260
tacactaaaa	aactaagaca	attttaat	tgotgcctgc	catatttcaa	tttggtataa	1320
attcctataa	tttatcctat	tagtagctaa	aaaaagatga	atgtgaatcg	aatcctaaga	1380
gaattgggca	agtgcacaaa	caatacttaa	ataaatacta	ctcagtaata	acctatttct	1440
tagcattttt	gacgaaat	gctattttgt	tagagtcttt	tacaccattt	gtctccacac	1500
ctccgcttac	atcaacacca	ataacgccat	ttaatctaag	cgcatcacca	acattttctg	1560
gcgtcagtc	accagctaac	ataaaatgta	agctctcggg	gctctcttgc	cttccaaacc	1620
agtcagaaat	cgagttccaa	tccaaaagtt	cacctgtccc	acctgcttct	gaatcaaaca	1680
agggaataaa	cgaatgaggt	ttctgtgaag	ctgcactgag	tagtatgttg	cagtcttttg	1740
gaaatacag	tcttttaata	actggcaaac	cgaggaactc	ttggtattct	tgccacgaact	1800
catctccgtg	cagttggacg	atatcaatgc	cgtaatcatt	gaccagagcc	aaaacatcct	1860
ccttaggttg	attacgaaac	acgccaaacca	agtatttcgg	agtgcctgaa	ctatttttat	1920
atgcttttac	aagacttgaa	attttccttg	caataaccgg	gtcaattgtt	ctctttctat	1980
tgggcacaca	tataataccc	agcaagtcag	catcggaatc	tagagcacat	tctgoggcct	2040
ctgtgctctg	caagccgcaa	actttcacca	atggaccaga	actacctgtg	aaattaataa	2100
cagacatact	ccaagctgcc	tttgtgtgct	taatcacgta	tactcacgtg	ctcaatagtc	2160
accaatgccc	tccctcttgg	ccctctcctt	ttcttttttc	gaccgaattt	cttgaagacg	2220
aaagggcctc	gtgatacgcc	tattttttata	ggttaatgtc	atgataataa	tggtttotta	2280
ggacggatcg	cttgccctgta	acttacacgc	gcctcgtatc	ttttaatgat	ggaataattt	2340
gggaatttac	tctgtgttta	tttattttta	tgttttgtat	ttggatttta	gaaagtaa	2400
aaagaaggta	gaagagttac	ggaatgaaga	aaaaaaaaata	aacaaagggt	taaaaaattt	2460
caacaaaaag	cgtactttac	atatatat	attagacaag	aaaagcagat	taaatagata	2520
tacattcgat	taacgataag	taaaatgtaa	aatcacagga	tttcgtgtg	tggtcttota	2580
cacagacaag	atgaaacaat	tcggcattaa	tacctgagag	caggaagagc	aagataaaag	2640
gtagtatttg	ttggcgatcc	ccctagagtc	ttttacatct	tcggaaaaca	aaaaactatt	2700
tttctttaat	ttcttttttt	actttctatt	tttaatttat	atatttatat	taaaaaattt	2760
aaattataat	tattttttata	gcacgtgatg	aaaaggaccc	aggtggcact	tttcggggaa	2820
atgtgcgcgg	aaccctatt	tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaata	tatccgotca	2880
tgagacaata	acctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	2940
aacatttccg	tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttctt	gtttttgtc	3000

acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt 3060
 acatcgaaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt 3120
 ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtgttgacg 3180
 cggggcaaga gcaactcggc cgcgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact 3240
 caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcctg 3300
 ccataacccat gagtataaac actgcggcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga 3360
 aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg 3420
 aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 3480
 tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac 3540
 aattaataga ctggatggag gcgataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 3600
 cggtcggctg gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca 3660
 ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggca 3720
 gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta 3780
 agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 3840
 atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 3900
 cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatcctt 3960
 cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac 4020
 cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttccgaag gtaactggct 4080
 tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 4140
 tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 4200
 ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttgactc aagacgatag ttaccggata 4260
 aggcgcagcg gtccggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 4320
 cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag 4380
 ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagc gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg 4440
 agcttccagg ggggaacgcc tggatatctt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 4500
 ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggccgag cctatggaaa aacgccagca 4560
 acgggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 4620
 cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 4680
 gcgcagccg aacgacagag cgcagcaggt cagttagcga ggaagcgga gagcgccaa 4740
 taogcaaac gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt 4800
 ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttac ctcaactcatt 4860

ES 2 683 847 T3

```

aggcaccoca ggctttacac tttatgcttc cggctcctat gttgtgtgga attgtgagcg 4920
gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctc ggaattaacc 4980
ctcactaaag ggaacaaaag ctggctagt 5009

```

```

<210> 73
<211> 5009
<212> ADN
<213> artificial

```

```

<220>
<223> Vector modificado pYDINhe

```

```

<400> 73

```

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgogt	60
cctcgtcttc acoggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctccgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggcccccac aaacottcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcagtgatt tttgatctat	300
taacagatat ataatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca aaaaaaatt gttaatatat	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
gactcactat agggaaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt	540
tacttgcgtg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagcacag gaactgacaa	600
ctatatgcga gcaaattccc tcaccaactt tagaatcgac gccgtactct ttgtcaacga	660
ctactatttt ggccaacggg aaggcaatgc aaggagtttt tgaatattac aaatcagtaa	720
cgtttgtcag taattgcggt tctcaccct caacaactag caaaggcagc ccataaaca	780
cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt	840
ctggtggtgg tggttctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtaog	900
acgatgacga taaggtacca ggatccagtg tgggtggaatt ctgcagatat ccagcacagt	960
ggcggccgct cgagtctaga gggcccttcg aaggtaagcc tatccctaac cctctcctcg	1020
gtctcgattc tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttgagtttaa acccgtgat	1080
ctgataacaa cagtgtagat gtaacaaaat cgactttggt ccactgtac ttttagctcg	1140
tacaaaatac aatatacttt tcatttctcc gtaaacaaca tgttttcca tgtaatatcc	1200
ttttctattt ttogttccgt taccaacttt acacatactt tatatagcta ttcaattcta	1260
tacactaaaa aactaagaca attttaattt tgctgcctgc catatttcaa tttgttataa	1320
attcctataa tttatcctat tagtagctaa aaaaagatga atgtgaatcg aatcctaaga	1380
gaattgggca agtgcacaaa caatacttaa ataaatacta ctcagtaata acctatttct	1440

tagcattttt	gacgaaattt	gctattttgt	tagagtcttt	tacaccattt	gtctccacac	1500
ctccgcttac	atcaacacca	ataacgccat	ttaatctaag	cgcacacca	acattttctg	1560
gcgtcagtc	accagctaac	ataaaatgta	agctctcggg	gctctcttgc	cttccaaccc	1620
agtcagaaat	cgagttccaa	tccaaaagtt	cacctgtccc	acctgcttct	gaatcaaaca	1680
agggaaataa	cgaatgaggt	ttctgtgaag	ctgcaactgag	tagtatgttg	cagtcttttg	1740
gaaatacgag	tcttttaata	actggcaaac	cgaggaactc	ttggtattct	tgccacgact	1800
catctccgtg	cagttggacg	atatcaatgc	cgtaatcatt	gaccagagcc	aaaacatcct	1860
ccttaggttg	attacgaaac	acgccaacca	agtatttcgg	agtgcctgaa	ctatttttat	1920
atgcttttac	aagacttgaa	attttccttg	caataaccgg	gtcaattggt	ctctttctat	1980
tgggcacaca	tataataccc	agcaagtcag	catcggaatc	tagagcacat	tctgoggcct	2040
ctgtgctctg	caagccgcaa	actttcacca	atggaccaga	actacctgtg	aaattaataa	2100
cagacatact	ccaagctgcc	tttgtgtgct	taatcacgta	tactcacgtg	ctcaatagtc	2160
accaatgcc	tcctctcttg	ccctctcctt	ttcttttttc	gaccgaattt	cttgaagacg	2220
aaagggcctc	gtgatacgcc	tatttttata	ggtaaatgtc	atgataataa	tggtttctta	2280
ggacggatcg	cttgcctgta	acttacacgc	gcctcgtatc	ttttaatgat	ggaataattt	2340
gggaatttac	tctgtgttta	tttattttta	tgttttgtat	ttggatttta	gaaagtaaat	2400
aaagaaggta	gaagagttac	ggaatgaaga	aaaaaaaata	aacaaagggt	taaaaaattt	2460
caacaaaaag	cgtactttac	atatatat	attagacaag	aaaagcagat	taaatagata	2520
tacattcgat	taacgataag	taaaatgtaa	aatcacagga	tttctgtgtg	tggctctcta	2580
cacagacaag	atgaaacaat	tcggcattaa	tacctgagag	caggaagagc	aagataaaag	2640
gtagtatttg	ttggcgatcc	ccctagagtc	ttttacatct	tcggaaaaca	aaaactattt	2700
tttctttaat	ttcttttttt	actttctatt	tttaatttat	atatttatat	taaaaaattt	2760
aaattataat	tattttttata	gcacgtgatg	aaaaggaccc	aggtggcact	tttcggggaa	2820
atgtgcggcg	aacccttatt	tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	2880
tgagacaata	acctgataa	atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	2940
aacattttccg	tgtcgccctt	attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttcc	gtttttgtct	3000
accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	3060
acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	tccttgagag	tttctgcccc	gaagaacggt	3120
ttccaatgat	gagcactttt	aaagttctgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtgttgacg	3180
ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	3240
caccagtcac	agaaaagcat	cttacgggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtctg	3300

ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgatc ggaggaccga 3360
aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg 3420
aacoggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa 3480
tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggaac 3540
aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc 3600
cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga gcgtgggtct cgcggtatca 3660
ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggca 3720
gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta 3780
agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc 3840
atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc 3900
cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccccggt agaaaagatc aaaggatctt 3960
cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgtac 4020
cagcgggtgg ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct ttttcogaag gtaactggct 4080
tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact 4140
tcaagaactc tgtagcacog cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg 4200
ctgccagtg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc aagacgatag ttaccggata 4260
aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga 4320
cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttccogaag 4380
ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgacagagg 4440
agcttcacag gggaacgcc tggatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac 4500
ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggccgag cctatggaaa aacgccagca 4560
acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg 4620
cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc 4680
gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagttagcga ggaagcggaa gagcgcccaa 4740
tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt 4800
ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttac ctactcatt 4860
aggcaccoca ggctttacac tttatgcttc cggctcctat gttgtgtgga attgtgagcg 4920
gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctc ggaattaacc 4980
ctcactaaag ggaacaaaag ctggctagt 5009

<210> 74
<211> 4605
<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> vector pYD1lnk

5

<400> 74

acggattaga agccgcgcgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc accgggtcgcg ttcttgaaac gcagatgtgc ctgcgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggcccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
gactcactat agggaaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt	540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagccgct ggggccatgg	600
ttactgattg gcgcgcgcga tccttcagac tctgcagaat tcggccgcgt acttaattaa	660
gtttaaaccc gctgatctga taacaacagt gtagatgtaa caaaatcgac tttgttccca	720
ctgtactttt agctcgtaca aaatacaata tacttttcat ttctccgtaa acaacatggt	780
ttcccatgta atatcctttt ctatttttog ttccgttacc aactttacac atactttata	840
tagctattca cttctataca ctaaaaaact aagacaattt taattttgcg gctgcccata	900
tttcaatttg ttataaattc ctataattta tcctattagt agctaaaaaa agatgaatgt	960
gaatcgaatc ctaagagaat tgggcaagtg cacaacaat acttaaataa atactactca	1020
gtaataacct atttcttagc atttttgacg aaatttgcta ttttgtaga gtcttttaca	1080
ccatttgtct ccacacctcc gcttacatca acaccaataa cgccatttaa tctaagcgca	1140
tcaccaacat tttctggcgt cagtcacca gctaacataa aatgtaagct ctccgggctc	1200
tcttgcttc caaoccagtc agaaatcgag ttccaatoca aaagttcacc tgtccacct	1260
gcttctgaat caaacaaggg aataaacgaa tgaggtttct gtgaagctgc actgagtagt	1320
atgttgacgt cttttggaaa tacgagtcct ttaataactg gcaaaccgag gaactcttgg	1380
tattcttgcc acgaatcctc tcctgacgtc tggacgatat caatgccgta atcattgacc	1440
agagccaaaa catcctcctt aggttgatta cgaaacacgc caaccaagta tttcggagtg	1500
cctgaactat ttttatatgc ttttacaaga cttgaaattt tccttgcaat aacggggtca	1560
attgttctct ttctattggg cacacatata ataccagca agtcagcatc ggaatctaga	1620
gcacattctg cggcctctgt gctctgcaag ccgcaaaact tcaccaatgg accagaacta	1680
cctgtgaaat taataacaga catactccaa gctgcctttg tgtgcttaat cacgtatact	1740

cacgtgctca atagtcacca atgccctccc tcttgccct ctccttttct tttttcgacc	1800
gaatttcttg aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga	1860
taataatggg ttcttaggac ggatcgcttg cctgtaactt acacgcgcct cgtatctttt	1920
aatgatggaa taatttgga atttactctg tgtttattta tttttatggt ttgtatttg	1980
attttagaaa gtaaataaag aaggtagaag agttacggaa tgaagaaaaa aaaataaaca	2040
aaggtttaaa aaatttcaac aaaaagcgta ctttacatat atatttatta gacaagaaaa	2100
gcagattaaa tagatataca ttcgattaac gataagtaaa atgtaaaatc acaggatttt	2160
cgtgtgtggg cttctacaca gacaagatga aacaattcgg cattaatacc tgagagcagg	2220
aagagcaaga taaaaggtag tatttggttg cgatccccct agagtctttt acatcttcgg	2280
aaaacaaaaa ctattttttc ttttaatttct ttttttactt tctattttta atttatatat	2340
ttatattaaa aaattttaa tataattatt tttatagcac gtgatgaaaa ggaccaggt	2400
ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttggt tatttttcta aatacattca	2460
aatatgtatc cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg	2520
aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc	2580
cttctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg	2640
ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt	2700
cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggt	2760
ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat	2820
gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga	2880
gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt acttctgaca	2940
acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact	3000
cgccctgata gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc	3060
acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact	3120
ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt	3180
ctgcgctcgg cccttcggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt	3240
gggtctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt	3300
atctacacga cgggcagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata	3360
ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag	3420
attgatttaa aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat	3480
ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttcact gagcgtcaga ccccgtagaa	3540
aagatcaaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaa	3600
aaaaaacac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt	3660

ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg 3720
tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaato 3780
ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga 3840
cgatagttac cggataaggc gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc 3900
agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc 3960
gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca 4020
ggagagcgcga cgagggagct tccagggggg aacgcctggg atctttatag tctgtcggg 4080
tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gccgagccta 4140
tggaaaaacg ccagcaacgc ggctttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct 4200
cacatgttct ttctgcgtt atccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag 4260
tgagctgata ccgctcgcgc cagccgaacg accgagcgcga gcgagtcagt gagcgaggaa 4320
gcggaagagc gcccaatacg caaacgcct ctcccgcgc gttggccgat tcattaatgc 4380
agctggcacg acaggtttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc aattaatgtg 4440
agttacotca ctcataggc accccaggct ttacacttta tgcttcggc tctatgttg 4500
tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc 4560
aagctcggaa ttaaccctca ctaaaggga caaaagctgg ctagt 4605

<210> 75
<211> 4886
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> vector pYDImata

<400> 75

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60
cctcgtcttc accggtcgcg ttctgaaac gcagatgtgc ctccgcgcgc actgctccga 120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgoga 240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat 300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc 360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatat 420
ctctataact taacgtcaag gagaaaaaac ccggatcgg actactagca gctgtaatac 480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagccgct ggggccatgg 600

ttactgattg ggcgcgcgga tccgatgtaa caaaatcgac tttgttccca ctgtactttt	660
agctcgtaca aaatacaata tacttttcat ttctccgtaa acaacatggt ttcccatgta	720
atatcctttt ctatttttcg ttccggtacc aactttacac atactttata tagctattca	780
cttotatata ctaaaaaact aagacaattt taattttgct gcctgccata tttcaatttg	840
ttataaattc ctataattta tcctattagt agctaaaaaa agatgaatgt gaatcgaatc	900
ctaagagaat tgctgcagaa ttcggcgcg tacttaatta agtttaaacc cgctgatctg	960
ataacaacag tgtagatgta acaaaatcga ctttgttccc actgtacttt tagctcgtac	1020
aaaatacaat atacttttca ttctccgta aacaacatgt tttcccatgt aatatccttt	1080
tctatttttc gttccgttac caactttaca catactttat atagctattc acttctatac	1140
actaaaaaac taagacaatt ttaattttgc tgccctgccat atttcaattt gttataaatt	1200
cctataattt atcctattag tagctaaaaa aagatgaatg tgaatcgaat cctaagagaa	1260
ttgggcaagt gcacaaacaa tacttaataa aatactactc agtaataacc tatttcttag	1320
catttttgac gaaatttgct attttggttag agtcctttac accatttgtc tccacacctc	1380
cgcttacatc aacaccaata acgccattta atctaagcgc atcaccaaca ttttctggcg	1440
tcagtcaccc agctaacata aaatgtaagc tctcggggct ctcttgccct ccaaccagt	1500
cagaaatcga gttccaatcc aaaagttcac ctgtcccacc tgcttotgaa tcaaacaagg	1560
gaataaacga atgaggtttc tgtgaagctg cactgagtag tatggtgcag tcttttgga	1620
atacgagtct ttaataact ggcaaaccga ggaactcttg gtattcttgc cactgactcat	1680
ctccgtgcag ttggacgata tcaatgccgt aatcattgac cagagccaaa acatcctcct	1740
taggttgatt acgaaacacg ccaaccaagt atttcggagt gcctgaacta tttttatatg	1800
cttttacaag acttgaaatt ttcccttgcaa taaccgggtc aattggtctc tttctattgg	1860
gcacacatat aatacccagc aagtcagcat cggaatctag agcacattct gcggcctctg	1920
tgctctgcaa gccgcaaaact ttcaccaatg gaccagaact acctgtgaaa ttaataacag	1980
acatactcca agctgccttt gtgtgcttaa tcacgtatac tcacgtgctc aatagtcacc	2040
aatgcctccc ctcttgggcc tctccttttc ttttttcgac cgaatttctt gaagacgaaa	2100
gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagga	2160
oggatcgctt gcctgtaact tacaogogcc tcgtatcttt taatgatgga ataatttggg	2220
aatttactct gtgtttattt atttttatgt tttgtatttg gattttagaa agtaaataaa	2280
gaaggtagaa gagttacgga atgaagaaaa aaaaataaac aaagggttaa aaaatttcaa	2340
caaaaagcgt actttacata tatatttatt agacaagaaa agcagattaa atagatatac	2400
attcgattaa cgataagtaa aatgtaaaat cacaggattt tcgtgtgtgg tcttctacac	2460
agacaagatg aaacaattcg gcattaatac ctgagagcag gaagagcaag ataaaaggta	2520

gtattttgttg gogatcccc tagagtcttt tacatcttcg gaaaacaaaa actatttttt 2580
 ctttaatttc tttttttact ttctattttt aatttatata tttatattaa aaaattttaa 2640
 ttataattat ttttatagca cgtgatgaaa aggaccagg tggcactttt cggggaaatg 2700
 tgcgcggaac ccctatttgt ttatttttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 2760
 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 2820
 atttcogtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg ccttcctgtt ttgctcacc 2880
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga gtgggttaca 2940
 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 3000
 caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt gttgacgccg 3060
 ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gactactcac 3120
 cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 3180
 taocatgag tgataacact gcgccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg 3240
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttggaac 3300
 cggagctgaa tgaagcata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 3360
 caacaacggt ggcgaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 3420
 taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttcogg 3480
 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 3540
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggcagtc 3600
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 3660
 attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 3720
 ttttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 3780
 aaogtgagtt ttogttccac tgagcgtcag acccogtaga aaagatcaaa ggatcttctt 3840
 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 3900
 cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 3960
 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 4020
 agaactctgt agcaccgctt acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 4080
 ccagtggoga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 4140
 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 4200
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 4260
 gaaaggogga caggatatcg gtaagcggca gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc 4320
 ttccaggggg gaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 4380

ES 2 683 847 T3

```

agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg 4440
cggccttttt acgggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 4500
tatccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 4560
gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgccaatac 4620
gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggcga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc 4680
ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttacctc actcattagg 4740
caccacaggc ttacacttt atgcttcgg ctcctatgtt gtgtggaatt gtgagcggat 4800
aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgga attaaccctc 4860
actaaaggga acaaaagctg gctagt 4886

```

<210> 76
 <211> 5801
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> vector pYDlgaI

<400> 76

acggattaga agccgcgcgag cgggtgacag ccctocgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc accggtcgcg ttcttgaaac gcagatgtgc ctgcgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatac	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt	540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagccgct ggggccatgg	600
ttactgattg gcgcgcgcga tccgatgtaa caaaatcgac tttgttccca ctgtactttt	660
agctcgtaca aaatacaata tacttttcat ttctocgtaa acaacatggt ttcccatgta	720
atatcctttt ctatttttctg ttccggttacc aaotttacac atactttata tagctattca	780
cttctataca ctaaaaaact aagacaattt taattttgct gcctgccata tttcaatttg	840
ttataaatc ctataattta tcctattagt agctaaaaaa agatgaatgt gaatcgaatc	900
ctaagagaat tgctgcagaa ttcacggatt agaagccgcc gagcgggtga cagccctccg	960
aaggaagact ctctccgtg cgtctcgtc ttcacccgtc gcgttctctga aacgcagatg	1020
tgctcgcgc cgcactgctc cgaacaataa agattctaca atactagctt ttatgggttat	1080

gaagaggaaa aattggcagt aacctggccc cacaaacott caaatgaacg aatcaaatta 1140
 acaaccatag gatgataatg cgattagttt tttagcotta tttctggggt aattaatcag 1200
 cgaagcgatg atttttgatc tattaacaga tatataaatg caaaaactgc ataaccactt 1260
 taactaatac tttcaacatt ttcggtttgt attacttott attcaaagt aataaaagta 1320
 tcaacaaaaa attgttaata tacctctata ctttaacgtc aaggagaaaa aaccccgat 1380
 cggactacta gcagotgtaa tacgactcac tatagggaat attaagctaa ttctacttca 1440
 tacatthttca attaatgtc agttacttog ctgtthttca atatthttctg ttattgtctc 1500
 agthtttagca caggaactga caactatatg cgagcaaatc cctcaccaa ctttagaatc 1560
 gacgccttac tctttgtcaa cgactactat tttggccaac gggaaggcaa tgcaaggagt 1620
 ttttgaatat tacaaatcag taacgtttgt cagtaattgc ggttctcac cctcaacaac 1680
 tagcaaaggc agccccataa acacacagta tgtthttaag cttctgcagg ctagtgttg 1740
 tgggtggttct ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct gctagcatga ctggtggcca 1800
 gcaaggcta attctgatgc ggcgcacat catcaccatc accattgatt aattaagttt 1860
 aaaccgctg atctgataac aacagtgtag atgtaacaaa atcgacttg tccactgt 1920
 actthtagct cgtacaaaat acaatatact tttcatttct cgtaaaaca catgtthtcc 1980
 catgtaatat cctthttctat ttttcgttcc gttaccaact ttacacatac tttatatagc 2040
 tattcacttc tatacactaa aaaactaaga caatthtaat tttgctgct gccatatttc 2100
 aattgttat aaattoctat aatttatct attagtagct aaaaaagat gaatgtgaat 2160
 cgaatctaa gagaattggg caagtgcaca aacaatactt aaataaatc tactcagtaa 2220
 taacctattt cttagcattt ttgacgaaat ttgctattt gttagagtct tttacaccat 2280
 ttgtctcac aactcgtt acatcaaac caataacgc atttaatcta agcgcacac 2340
 caacattthc tggcgtcagt ccaccagcta acataaatg taagctctcg ggcctctctt 2400
 gccttccaac ccagtcagaa atcgagttcc aatccaaaag ttcacctgtc ccacctgctt 2460
 ctgaatcaaa caagggaata aacgaatgag gtttctgtga agctgcactg agtagtatgt 2520
 tgcagtcttt tggaaatacg agtctthta taactggcaa accgaggaac tcttggtatt 2580
 cttgccacga ctcatctcg tgcagttgga cgatatcaat gccgtaatca ttgaccagag 2640
 ccaaacatc ctcttaggt tgattacgaa acacgccaac caagtatttc ggagtgcctg 2700
 aactatttht atatgttht acaagacttg aaattthtct tgcaataacc ggttcaattg 2760
 ttctctthtct attgggcaca catataatac ccagcaagtc agcatcgga tctagagcac 2820
 attctgcggc ctctgtgctc tgcaagccgc aaactthcac caatggacca gaactacctg 2880
 tgaaattaat aacagacata ctccaagctg ctttgtgtg cttaatcac tatactcacg 2940

tgctcaatag	tcaccaatgc	cctccctctt	ggccctctcc	ttttcttttt	tcgaccgaat	3000
ttcttgaaga	cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcatgataat	3060
aatggtttct	taggaaggat	cgcttgccctg	taacttacac	gcgcctcgta	tcttttaatg	3120
atggaataat	ttgggaattt	actctgtgtt	tatttatctt	tatgttttgt	atttggtatt	3180
tagaaagtaa	ataaagaagg	tagaagagtt	acggaatgaa	gaaaaaaaa	taaacaaagg	3240
tttaaaaaat	ttcaacaaaa	agcgtacttt	acatatatat	ttattagaca	agaaaagcag	3300
attaaataga	tatacattcg	attaacgata	agtaaaatgt	aaaatcacag	gattttctgt	3360
tgtggtcttc	tacacagaca	agatgaaaca	attcggcatt	aatacctgag	agcaggaaga	3420
gcaagataaa	aggtagtatt	tgttgccgat	ccccctagag	tcttttacat	cttcggaaaa	3480
caaaaactat	ttttctttta	atttcttttt	ttactttcta	tttttaattt	atatatttat	3540
attaaaaaat	ttaaattata	attattttta	tagcacgtga	tgaaaaggac	ccaggtggca	3600
cttttcgggg	aatgtgcgc	ggaaccctta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	3660
tgtatccgct	catgagacaa	taaccctgat	aatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	3720
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgcct	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	3780
ctgtttttgc	tcaccagaaa	acgttggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	3840
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	3900
ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	3960
cccgtgttga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	4020
tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tggcatgaca	gtaagagaat	4080
tatgcagtgc	tgccataacc	atgagtgata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	4140
tcggaggacc	gaaggagcta	acogcttttt	tgcaacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	4200
ttgatcgttg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	4260
tgccctgtage	aatggcaaca	acgttgccga	aactattaac	tgccgaacta	cttactctag	4320
cttcccggca	acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	4380
gctcgccctt	tcgggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggt	gagcgtgggt	4440
ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatat	gtagttatct	4500
acacgacggg	cagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagataggtg	4560
cctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	cttttagattg	4620
atttaaaaact	tcatttttta	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	4680
tgaccaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	4740
tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgccggtaat	ctgctgcttg	caaacaaaaa	4800
aaccaccgct	accagcgggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	4860

aggtaactgg cttcagcaga ggcgagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 4920
 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt 4980
 taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 5040
 agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct 5100
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca 5160
 cgcttcccga agggagaaa ggcgacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 5220
 agcgcacgag ggagcttcca ggggggaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc 5280
 gccacctctg acttgagcgt cgatttttct gatgctcgtc agggggggccg agcctatgga 5340
 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca 5400
 tgttctttcc tgcggtatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 5460
 ctgataccgc tcgcgcgagc cgaacgaccg agcgagcgga gtcagtgagc gaggaagcgg 5520
 aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct 5580
 ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt 5640
 acctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tcgggtcct atgttggtgtg 5700
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc 5760
 tcggaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggctag t 5801

<210> 77
 <211> 692
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> 4D5H

<400> 77

ggccagcaag gccaaagaggt tcaactagtg gagtctggcg gtggcctggg gcagccaggg 60
 ggctcactcc gtttgtcctg tgcagcttct ggcttcaaca ttaaagacac ctatatacac 120
 tgggtgcgtc agggcccggg taagggcctg gaatgggttg caaggattta tcctacgaat 180
 gggtatacta gatatgocga tagcgtcaag ggccgtttca ctataagcgc agacacatcc 240
 aaaaacacag cctacctgca gatgaacagc ctgctgctg aggacactgc cgtctattat 300
 tgttctagat ggggagggga cggcttctat gctatggact actggggtca aggaaccctg 360
 gtcaccgtct cctcggctag caccaagggc cccagcgtgt tccctctggc cccagctcc 420
 aagagcacct ccggcggcac cggcgccctg ggctgcctgg tgaaggatta cttcccagag 480
 cccgtgaccg tgagctggaa cagcggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctttcccgcc 540
 gtgctgcagt ccagcggcct gtactccctg agcagcgtgg tgaccgtgcc cagcagcagc 600
 ctgggacccc agacctacat ctgcaatgtg aaccacaagc ccagcaatac caaggtggat 660
 aagaaggtgg agcccaagag ctgcgcggcc gc 692

<210> 78
 <211> 661
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> 4D5L

<400> 78

ccatggcgga tatccagatg acccagtcct cgagctccct gtccgcctct gtgggcgata 60
 gggtcaccat cacctgccgt gccagtcagg atgtgaatac tgctgtagcc tggatatcaac 120
 agaaaccagg aaaagctccg aaactactga ttactcggc atccttctct tactctggag 180
 tcccttctcg cttctctgga tccagatctg ggacggattt cactctgacc atcagcagtc 240
 tgcagccgga agacttcgca acttattact gtcagcaaca ttatactact cctcccacgt 300
 tcggacaggg taccaagggt gagatcaaac gtacgggtggc ggcgccatct gtcttcatct 360
 tcccgccatc tgatgagcag cttaagtctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata 420
 acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtga taacgccctc caatcgggta 480
 actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctacgagca 540
 ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc 600
 atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tgaggcgcgc 660
 c 661

<210> 79
 <211> 6468

<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> vector pYD4D5hc

<400> 79

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
ccctgtcttc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctcgccgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatatac	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccggatcgg actactagca gctgtaatac	480

gactcactat aggggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540
 tacttgcgtg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagccgct ggggccatgg 600
 ttactgattg gcgcgcggga tccgatgtaa caaaatcgac tttgttccca ctgtactttt 660
 agctcgtaaca aaatacaata tacttttcat ttctccgtaa acaacatgtt ttcccatgta 720
 atatcctttt ctattttttgc ttccgttacc aactttacac atactttata tagctattca 780
 cttctataca ctaaaaaact aagacaattt taattttgct gcctgccata tttcaatttg 840
 ttataaattc ctataattta tcttattagt agctaaaaaa agatgaatgt gaatcgaatc 900
 ctaagagaat tgctgcagaa ttcacggatt agaagccgcc gagcgggtga cagccctccg 960
 aaggaagact ctctccgtg cgtcctcgtc ttcaccggtc gcgttcctga aacgcagatg 1020
 tgccctgcgc cgcactgctc cgaacaataa agattctaca atactagctt ttatggttat 1080
 gaagaggaaa aattggcagt aacctggccc cacaaacctt caaatgaacg aatcaaatta 1140
 acaaccatag gatgataatg cgattagttt tttagcctta tttctggggg aattaatcag 1200
 cgaagcgatg atttttgatc tattaacaga tatataaatg caaaaactgc ataaccactt 1260
 taactaatac tttcaacatt ttccggtttgt attacttctt attcaaagt aataaaagta 1320
 tcaacaaaaa attgttaata tacctctata ctttaacgtc aaggagaaaa aaccccggat 1380
 cggactacta gcagctgtaa taagactcac tatagggaat attaagctaa ttctacttca 1440
 tacattttca attaagatgc agttacttgc ctgtttttca atattttctg ttattgcttc 1500
 agtttttagca caggaactga caactatatg cgagcaaact cctcaccaa ctttagaatc 1560
 gaagcagtao tctttgtcaa cgactactat tttggccaac ggaagggcaa tgcaaggagt 1620
 ttttgaatat tacaatcag taacgtttgt cagtaattgc ggttctcacc cctcaacaac 1680
 tagcaaaggc agccccataa acacacagta tgtttttaag cttctgcagg ctagtgggtg 1740
 tgggtggttct ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct gctagcatga ctgggtggcca 1800
 gcaaggccaa ggttctgagg ttcaactagt ggagtctggc ggtggcctgg tgcagccagg 1860
 gggctcactc cgtttgtcct gtgcagcttc tggcttcaac attaaagaca cctatatata 1920
 ctgggtgcgt caggccccgg gtaagggcct ggaatgggtt gcaaggattt atcctacgaa 1980
 tggttatact agatatgccg atagcgtcaa gggccgtttc actataagcg cagacacatc 2040
 caaaaacaca gcctacctgc agatgaacag cctgcgtgct gaggacactg ccgtctatta 2100
 ttgttctaga tggggagggg acggcttcta tgctatggac tactggggtc aaggaacctt 2160
 ggtcaccgtc tctcgggcta gcaccaaggg cccagcgtg ttccctctgg cccccagctc 2220
 caagagcacc tccggcgga cccgcgcctt gggctgcctg gtgaaggatt acttcccaga 2280
 gcccgtagcc gtgagctgga acagcggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ctttccccgc 2340

cgtgctgcag tccagcggcc tgtactccct gagcagcgtg gtgaccgtgc ccagcagcag 2400
 cctgggcacc cagacctaca tctgcaatgt gaaccacaag cccagcaata ccaaggtgga 2460
 taagaagggtg gagccaaga gctgocgggc cgcacatcat caccatcacc attgattaat 2520
 taagttttaa cccgctgac tgataacaac agtgtagatg taacaaaatc gactttgttc 2580
 ccactgtact tttagctcgt acaaaataca atatactttt catttctccg taaacaacat 2640
 gttttcccat gtaatatcct tttctatttt tcttccgtt accaacttta cacatacttt 2700
 atatagctat tcacttctat acactaaaaa actaagacaa ttttaatttt gctgcctgcc 2760
 atatttcaat ttgttataaa ttctataat ttatcctatt agtagctaaa aaaagatgaa 2820
 tgtgaatcga atcctaagag aattgggcaa gtgcacaaac aataacttaa taaatactac 2880
 tcagtaataa cctattttct agcatttttg acgaaatttg ctattttgtt agagtctttt 2940
 acaccatttg tctccacacc tccgcttaca tcaacaccaa taacgccatt taatctaagc 3000
 gcatcaccaa catthttctg cgtcagtcga ccagctaaca taaaatgtaa gctctcgggg 3060
 ctctcttgcc ttccaaccca gtcagaaatc gagttccaat ccaaaagttc acctgtccca 3120
 cctgcttctg aatcaaacaa gggaataaac gaatgaggtt tctgtgaagc tgcactgagt 3180
 agtatgttgc agtcttttg aaatacgagt cttttaataa ctggcaaacc gaggaactct 3240
 tggattctt gccacgactc atctccgtgc agttggacga tatcaatgcc gtaatcattg 3300
 accagagcca aaacatcctc cttaggttga ttacgaacaa cgcacaacaa gtatttcgga 3360
 gtgcctgaac tattttttata tgcttttaca agacttgaaa ttttcttgc aataaccggg 3420
 tcaattgttc tctttctatt gggcacacat ataataccca gcaagtcagc atcggaatct 3480
 agagcacatt ctgcggcctc tgtgctctgc aagccgcaa ctttcaccaa tggaccagaa 3540
 ctacctgtga aattaataac agacatactc caagctgcct ttgtgtgctt aatcacgtat 3600
 actcacgtgc tcaatagtc ccaatgcct cctcttggc cctctcctt tctttttctg 3660
 accgaatttc ttgaagacga aagggcctcg tgatacgctt atttttatag gttaatgtca 3720
 tgataataat ggtttcttag gacggatcgc ttgcctgtaa cttacacgcg cctcgtatct 3780
 tttaatgatg gaataatttg ggaatttact ctgtgtttat ttatttttat gttttgtatt 3840
 tggatttttag aaagtaaata aagaaggtag aagagttacg gaatgaagaa aaaaaataa 3900
 acaaaggttt aaaaaatttc aacaaaaagc gtactttaca tatatattta ttagacaaga 3960
 aaagcagatt aaatagatat acattcgatt aacgataagt aaaatgtaa atcacaggat 4020
 tttcgtgtgt ggtcttctac acagacaaga tgaaacaatt cggcattaat acctgagagc 4080
 aggaagagca agataaaagg tagtatttgt tggcgatccc cctagagtct ttacatctt 4140
 cggaaaacaa aaactatttt ttctttaatt tcttttttta ctttctattt ttaatttata 4200
 tatttatatt aaaaaattta aattataatt atttttatag cacgtgatga aaaggacca 4260

ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccoctatth gtttattttt ctaaatacat 4320
 tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa 4380
 aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtgcgccctta ttcccttttt tgccgcattt 4440
 tgcocttctg tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag 4500
 ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt 4560
 tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg 4620
 gtattatccc gtgttgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag 4680
 aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta 4740
 agagaattat gcagtgcctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg 4800
 acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta 4860
 actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac 4920
 accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt 4980
 actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca 5040
 cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag 5100
 cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta 5160
 gttatctaca cgacgggcag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag 5220
 ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt 5280
 tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 5340
 aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 5400
 gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 5460
 acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt 5520
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag 5580
 ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcacgcg ctacatacct cgtctgcta 5640
 atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttacggg gttggactca 5700
 agacgatagt taccggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc gtgcacacag 5760
 ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa 5820
 agcggccacgc ttcccgaaag gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcggg 5880
 acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg gggaacgcct ggtatcttta tagtctgtc 5940
 gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggccgagc 6000
 ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt 6060
 gctcacatgt tcttctctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 6120

gagtgagctg ataccgctcg cgcgagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag 6180
 gaagcggaag agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa 6240
 tgcagctggc acgacagggt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat 6300
 gtgagttacc tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcctatg 6360
 ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 6420
 gccaaagctcg gaattaaccc tcactaaagg gaacaaaagc tggctagt 6468

<210> 80
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> 4D5hp

<400> 80

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

ES 2 683 847 T3

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

<210> 81
<211> 7100
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> vector pYD4D5hl

<400> 81

acggattaga agccgcgcgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360
ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatat	420
ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac ccggatcgg actactagca gctgtaatac	480
gactcactat agggaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt	540
tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt gctagccgct ggggccatgg	600
eggatatcca gatgaccag tccccgagct ccctgtccgc ctctgtgggc gatagggcca	660
ccatcacctg ccgtgccagt caggatgtga atactgctgt agcctggtat caacagaaac	720
caggaaaagc tccgaaacta ctgatttact cggcatcctt cctctactct ggagtcctt	780
ctcgtctctc tggatccaga tctgggacgg atttcaactc gaccatcagc agtctgcagc	840
cggaagactt cgcaacttat tactgtcagc aacattatac tactcctccc acgttcggac	900
agggtaacca ggtggagatc aaacgtacgg tggcggcgcc atctgtcttc atcttccgc	960
catctgatga gcagcttaag tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct	1020
atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc	1080
aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcacccctga	1140

cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagc	1200
gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttgaggc gcgccggatc	1260
cgatgtaaca aaatcgactt tgttccact gtacttttag ctcgtacaaa atacaatata	1320
cttttcattt ctccgtaaac aacatgtttt cccatgtaat atccttttct atttttcgtt	1380
ccgttaccaa ctttacacat actttatata gctattcact tctatacact aaaaaactaa	1440
gacaatttta attttgctgc ctgccatatt tcaatttggt ataaattcct ataatttatc	1500
ctattagtag ctaaaaaaag atgaatgtga atcgaatcct aagagaattg ctgcagaatt	1560
cacggattag aagccgccga ggggtgaca gccctccgaa ggaagactct cctccgtgcg	1620
tctcgtctt caccggtcgc gttcctgaaa cgcagatgtg cctcggcccg cactgctccg	1680
aacaataaag attctacaat actagctttt atggttatga agaggaaaaa ttggcagtaa	1740
cctggcccca caaaccttca aatgaacgaa tcaaattaac aaccatagga tgataatgcg	1800
attagttttt tagccttatt tctggggtaa ttaatcagcg aagcgatgat ttttgatcta	1860
ttaacagata tataaatgca aaaactgcat aaccacttta actaatactt tcaacatttt	1920
cggtttgtat tacttcttat tcaaagttaa taaaagtatc aacaaaaaat tgttaatata	1980
cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa ccccgatcg gactactagc agctgtaata	2040
cgactcacta tagggaatat taagctaatt ctacttcata cattttcaat taagatgcag	2100
ttacttcgct gtttttcaat attttctgtt attgcttcag ttttagcaca ggaactgaca	2160
actatatgcg agcaaattccc ctacccaact ttagaatcga cgcctactc tttgtcaacg	2220
actactatth tggccaacgg gaaggcaatg caaggagttt ttgaatatta caaatcagta	2280
acgtttgtca gtaattgcgg ttctcaccoc tcaacaacta gcaaaggcag ccccataaac	2340
acacagtatg tttttaagct tctgcaggct agtgggtgtg gtggttctgg tgggtggtgt	2400
tctggtggtg gtggttctgc tagcatgact ggtggccagc aaggccaaga ggttcaacta	2460
gtggagtctg gcggtggcct ggtgcagcca gggggctcac tccgtttgtc ctgtgcagct	2520
tctggettca acattaaaga cacctatata cactgggtgc gtcaggcccc gggttaagggc	2580
ctggaatggg ttgcaaggat ttatcctacg aatggttata ctagatatgc cgatagcgtc	2640
aagggccggt tcaactataag cgcagacaca tccaaaaaca cagcctacct gcagatgaac	2700
agcctgcgtg ctgaggacac tgccgtctat tattgttcta gatggggagg ggacggcttc	2760
tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc ctggtcaccg tctcctcggc tagcaccaag	2820
ggccccagcg tgttccctct ggccccagc tccaagagca cctccggcgg caccgccgcc	2880
ctgggctgcc tgggtgaagga ttacttccca gagcccgta ccgtagctg gaacagcggc	2940
gccctgacca gggcggtgca cacccttccc gccgtgctgc agtccagcgg cctgtactcc	3000
ctgagcagcg tggtgaccgt gccagcagc agcctgggca cccagacct catctgcaat	3060

gtgaaccaca agcccagcaa taccaaggtg gataagaagg tggagoccaa gagctgcgcg	3120
gccgcacatc atcaccatca ccattgatta attaagttta aaccgcgtga tctgataaca	3180
acagtgtaga tgtaacaaaa tcgactttgt toccactgta cttttagctc gtacaaaata	3240
caatatactt ttcattttctc cgtaaacaac atgttttccc atgtaatatc cttttctatt	3300
tttctgtccg ttaccaactt tacacatact ttatatagct attcacttct atacactaaa	3360
aaactaagac aatttttaatt ttgctgcctg ccatatttca atttggtata aattcctata	3420
atttatccta ttagtagcta aaaaaagatg aatgtgaatc gaatcctaag agaattgggc	3480
aagtgcacaa acaatactta aataaatact actcagtaat aacctatttc ttagcatttt	3540
tgacgaaatt tgctattttg ttagagtctt ttacaccatt tgtctccaca cctccgctta	3600
catcaacacc aataacgcc a ttaaatctaa gcgcatacc aacattttct gccgtcagtc	3660
caccagctaa cataaaatgt aagctctcgg ggctctcttg ccttccaacc cagtcagaaa	3720
tgcagttcca atccaaaagt tcacctgtcc cacctgcttc tgaatcaaac aagggaataa	3780
acgaatgagg tttctgtgaa gctgcactga gtagtatgtt gcagtctttt ggaaatacga	3840
gtcttttaat aactggcaaa ccgaggaact cttgggtattc ttgccacgac tcatctccgt	3900
gcagttggac gatataaatg ccgtaataat tgaccagagc caaaacatcc tccttaggtt	3960
gattacgaaa cagccaacc aagtatttcg gagtgcctga actattttta tatgctttta	4020
caagacttga aattttcctt gcaataaccg ggtcaattgt tctctttcta ttgggcacac	4080
atataatacc cagcaagtca gcatcggaat ctagagcaca ttctgcggcc tctgtgctct	4140
gcaagccgca aactttcacc aatggaccag aactacctgt gaaattaata acagacatac	4200
tccaagctgc ctttgtgtgc ttaatcacgt atactcacgt gctcaatagt caccaatgcc	4260
ctccctcttg gccctctcct tttctttttt cgaccgaatt tcttgaagac gaaagggcct	4320
cgtgatacgc ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt aggacggatc	4380
gcttgccctgt aacttacacg cgcctcgtat cttttaatga tggaataaatt tgggaattta	4440
ctctgtgttt atttattttt atgttttgta tttggatttt agaaagtaaa taaagaaggt	4500
agaagagtta cggaatgaag aaaaaaaaaat aaacaaaggt ttaaaaaatt tcaacaaaaa	4560
gcgtacttta catatatatt tattagacaa gaaaagcaga ttaaatagat atacattoga	4620
ttaacgataa gtaaaatgta aaatcacagg attttcgtgt gtggtcttct acacagacaa	4680
gatgaaacaa ttccggcatta atacctgaga gcaggaagag caagataaaa ggtagtattt	4740
gttggcgatc cccctagagt cttttacatc ttccgaaaac aaaaactatt ttttctttaa	4800
tttctttttt tactttctat ttttaattta tatatttata ttaaaaaatt taaattataa	4860
ttatttttat agcacgtgat gaaaaggacc caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg	4920

gaacccctat ttgtttatth ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat 4980
 aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc 5040
 gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa 5100
 cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttggtgc acgagtgggt tacatcgaa 5160
 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga 5220
 tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cgttattatc ccgtgttgac gccgggcaag 5280
 agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca 5340
 cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgt gccataacca 5400
 tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa 5460
 ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt tgatcgttg gaaccggagc 5520
 tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa 5580
 cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag 5640
 actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggccct ccggtggct 5700
 ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac 5760
 tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cagcagggc agtcaggcaa 5820
 ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt 5880
 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat 5940
 ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg 6000
 agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc 6060
 ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgttg 6120
 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag 6180
 cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggcaccac ttcaagaact 6240
 ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg 6300
 gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc 6360
 ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg 6420
 aactgagata cctacagcgt gagcattgag aaagcgccac gcttcccgaa gggagaaagg 6480
 cggacaggta tccggtgaag ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag 6540
 gggggaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc 6600
 gatttttgtg atgctcgtoa gggggggcca gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct 6660
 ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc 6720
 ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc 6780
 gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgccca atacgcaaac 6840

ES 2 683 847 T3

```

cgctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact 6900
ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta ctcactcat taggcacccc 6960
aggctttaca ctttatgctt ccggctccta tggtgtgtgg aattgtgagc ggataacaat 7020
ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagct cggaattaac ctcactaaa 7080
gggaacaaaa gctggctagt 7100

```

```

<210> 82
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

```

```

<220>
<223> 4D51p
<400> 82

```

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr	Ala	20	25	30	
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Ser	Ala	Ser	Phe	Leu	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Thr	Thr	Pro	Pro	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210													

<210> 83
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 83

5

Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

<210> 84

<211> 13

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15

<400> 84

Val	Ala	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Met	Val	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

20

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 85

Val	Ala	Arg	Lys	Asn	His	Arg	Lys	Trp	Arg	Arg	Thr	His
1				5					10			

30

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40

<400> 86

Val	Ser	Arg	Tyr	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Gln	Trp	Ala	His
1				5					10			

45

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

50

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 87

Val	Ala	Arg	His	Ser	Leu	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

55

<210> 88

<211> 13

<212> PRT
<213> artificial

<220>

5 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 88

Val Ala Arg Tyr Ser Gln Thr Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

10

<210> 89
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 89

20

Met Pro Arg Phe Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

<210> 90
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30

<400> 90

Val Thr Arg Tyr Ser Gln Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

35

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

40

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 91

Ile Glu Arg Tyr Ser Thr Arg Met Trp Ser Trp Ala His
1 5 10

45

<210> 92
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

55

<400> 92

Val Ala Arg His Ser Pro Glu Met Trp His Trp Ala His
1 5 10

```

5      <210> 93
      <211> 13
      <212> PRT
      <213> artificial

      <220>
      <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

10     <400> 93

          Val Ala Arg Gly Ser Pro Ser Met Trp Ser Trp Gly His
          1          5          10

15     <210> 94
      <211> 13
      <212> PRT
      <213> artificial

      <220>
      <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

20     <400> 94

          Val Ala Arg His Ser Gln Thr Met Trp His Trp Ala His
          1          5          10

25     <210> 95
      <211> 13
      <212> PRT
      <213> artificial

30     <220>
      <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

      <400> 95

35     <210> 96
      <211> 13
      <212> PRT
      <213> artificial

      <220>
      <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40     <400> 96

          Val Pro Arg Phe Ser Pro Thr Met Trp Lys Trp Ala His
          1          5          10

45     <210> 97
      <211> 13
      <212> PRT
      <213> artificial

50     <220>
      <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

```

<400> 97

Val Pro Arg Trp Ser Arg Thr Met Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

5 <210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 98

Val Pro Arg Tyr Ser Pro Arg Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

15 <210> 99
<211> 13
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

25 <400> 99

Ile Ala Arg His Ser Lys Ser Met Trp Ser Trp Ala His
1 5 10

30 <210> 100
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 100

Met Pro Arg Trp Ser Lys Ser Leu Ser Gly Trp Ala His
1 5 10

40 <210> 101
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 101

50 Val Ala Arg Tyr Thr Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

<210> 102
55 <211> 13
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

5 <400> 102

Val	Ala	Arg	Asn	Ser	Leu	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

<210> 103

10 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 103

Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Lys	Trp	Ala	His
1				5					10			

20

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 104

30

Val	Ala	Arg	Phe	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

<210> 105

35 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

40 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 105

Leu	Ala	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

45

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 106

Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
1				5					10			

55

<210> 107

<211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 107
 10 Val Pro Arg Ser Ser Leu Thr Met Trp Lys Trp Ala His
 1 5 10
 <210> 108
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 20 <400> 108
 Val Pro Arg His Ser Thr Arg Met Trp Lys Trp Ala His
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 109
 Val Pro Arg His Ser Arg Arg Met Trp Arg Trp Ala His
 1 5 10
 35 <210> 110
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 110
 45 Val Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
 1 5 10
 <210> 111
 <211> 13
 50 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 55 <400> 111

		Val	Thr	Arg	His	Ser	Ser	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
		1				5					10			
5	<210>	112												
	<211>	13												
	<212>	PRT												
	<213>	artificial												
10	<220>													
	<223>	Secuencia del bucle EF AA198ff												
	<400>	112												
		Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Ser	Met	Lys	Lys	Trp	Ala	His
		1				5				10				
15	<210>	113												
	<211>	13												
	<212>	PRT												
	<213>	artificial												
20	<220>													
	<223>	Secuencia del bucle EF AA198ff												
	<400>	113												
		Val	Ala	Arg	Gly	Ser	Thr	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Gly	His
		1				5				10				
25	<210>	114												
	<211>	13												
	<212>	PRT												
30	<213>	artificial												
	<220>													
	<223>	Secuencia del bucle EF AA198ff												
35	<400>	114												
		Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Glu	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
		1				5				10				
40	<210>	115												
	<211>	13												
	<212>	PRT												
	<213>	artificial												
45	<220>													
	<223>	Secuencia del bucle EF AA198ff												
	<400>	115												
		Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Thr	Gly	Met	Trp	Asn	Trp	Ala	His
		1				5				10				
50	<210>	116												
	<211>	13												
	<212>	PRT												
	<213>	artificial												
55	<220>													

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 116

	Val	Pro	Arg	Tyr	Ser	Gln	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
5	1				5					10			

<210> 117

<211> 13

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 117

	Val	Pro	Arg	Asn	Ser	Pro	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

<210> 118

20 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 118

	Leu	Ala	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Met	Ser	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

30 <210> 119

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 119

	Leu	Ala	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Met	Lys	Ser	Trp	Ala	His
	1				5					10			

<210> 120

45 <211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

50 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 120

	Leu	Pro	Arg	Tyr	Ser	Thr	Lys	Met	Lys	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

55 <210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

5

<400> 121

Leu Ala Arg Tyr Ser Gly Arg Met Lys Arg Trp Ala His
1 5 10

10

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 122

Ile Pro Arg Trp Ser Gln Gln Met Ser Arg Trp Ala His
1 5 10

20

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

25

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30

<400> 123

Val Gly Arg Trp Thr Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

35

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40

<400> 124

Val Lys Arg Ser Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

45

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

50

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 125

Leu Ala Arg Tyr Ser Pro Gly Met Trp Asn Trp Ala His
1 5 10

55

<210> 126
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 10 <400> 126

 Ile Ala Arg Tyr Ser Pro Asn Met Trp Asn Trp Ala His
 1 5 10

 <210> 127
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 20 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 127

 Ile Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
 1 5 10

 25 <210> 128
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 128
 35
 Val Ala Arg Phe Ser Pro Ser Met Leu Lys Trp Ala His
 1 5 10

 <210> 129
 40 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 45
 <400> 129

 Val Ala Arg Tyr Ser Lys Ser Met Leu Lys Trp Ala His
 1 5 10

 50 <210> 130
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

 55 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 130

	Val	Ala	Arg	His	Ser	Arg	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Gly	His
	1				5					10			

5 <210> 131
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 131

	Ile	Ala	Arg	His	Ser	Arg	Glu	Met	Leu	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

15 <210> 132
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 132

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Ser	Thr	Met	Ser	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

25 <210> 133
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 133

	Val	Pro	Arg	His	Ser	Leu	Lys	Lys	Leu	Gln	Arg	Lys	His
	1				5					10			

40 <210> 134
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 134

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Asn	Trp	Ala	His
	1				5					10			

50 <210> 135
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

55

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 135

5

Val Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Gly His
1 5 10

<210> 136

<211> 13

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15

<400> 136

Val Pro Arg Tyr Ser Ala Ser Met Trp Arg Trp Gly His
1 5 10

20

<210> 137

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

25

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 137

Val Pro Arg Tyr Ser Ala Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

30

<210> 138

<211> 13

<212> PRT

35

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40

<400> 138

Leu Pro Arg Tyr Ser Pro Gly Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

45

<210> 139

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

50

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 139

Val Ala Arg Tyr Ser Gln Thr Met Ser Arg Trp Ala His
1 5 10

55

<210> 140

<211> 13

<212> PRT
<213> artificial

<220>
5 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 140

Val Ala Gly Tyr Arg Pro Arg Arg Ser Gly Ser Ser His
1 5 10

10 <210> 141
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 141

20 Leu Ala Arg His Ser Ala Asn Met Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

<210> 142
<211> 13
25 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30 <400> 142

Val Ala Arg His Ser Pro Ser Met Trp Ser Trp Ala His
1 5 10

35 <210> 143
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

40 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 143

Val Ala Arg Trp Ser Pro Ser Met Phe Arg Trp Ala His
1 5 10

45 <210> 144
<211> 13
<212> PRT
50 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

55 <400> 144

	Val	Ala	Arg	Trp	Ser	Pro	Ser	Met	Leu	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

5 <210> 145
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 145

	Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

15 <210> 146
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 146

	Val	Thr	Arg	Trp	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

25 <210> 147
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

35 <400> 147

	Val	Ala	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

40 <210> 148
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 148

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Thr	Met	Trp	Lys	Trp	Ala	His
	1				5					10			

50 <210> 149
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 149

Val Ser Arg Phe Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

5 <210> 150
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 150

Ile Pro Arg Tyr Thr Pro Ser Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

20 <210> 151
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 151

Val Pro Arg Tyr Ser Thr Leu Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

30 <210> 152
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 152

Leu Pro Arg His Ser Arg Arg Met Trp Arg Trp Ala His
1 5 10

40 <210> 153
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 153

Leu Ala Arg Trp Ser Pro Ser Met Leu Arg Trp Ala His
1 5 10

55 <210> 154
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 154

	Val	Ala	Arg	His	Ser	Pro	Ala	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
5	1				5					10			

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 155

	Val	Pro	Arg	His	Ser	Ala	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
15	1				5					10			

<210> 156

<211> 13

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 156

	Val	Pro	Arg	Tyr	Ser	Ala	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
	1				5					10			

30 <210> 157

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 157

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Pro	Arg	Met	Trp	Arg	Trp	Ala	His
40	1				5					10			

<210> 158

<211> 13

<212> PRT

45 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 158

	Val	Ala	Arg	Tyr	Ser	Arg	Lys	Met	Ser	Ser	Trp	Gly	His
	1				5					10			

55 <210> 159

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 159

5

Leu Ala Ser Tyr Ser Pro Ser Met Trp Arg Trp Gly His
 1 5 10

<210> 160
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> artificial

10

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15

<400> 160

Val Ala Arg Tyr Ser Pro Thr Met Lys Arg Trp Ala His
 1 5 10

20

<210> 161
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

25

<220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 161

30

Tyr Leu His Gly Asp
 1 5

<210> 162
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

35

<220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

40

<400> 162

Tyr Leu Tyr Gly Asp
 1 5

<210> 163
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

45

<220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

50

<400> 163

Tyr Leu Ser Ala Asp
 1 5

55

<210> 164
 <211> 5

	<212> PRT				
	<213> artificial				
	<220>				
5	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff				
	<400> 164				
		Leu	Ser	Leu	Pro
10		1			5
	<210> 165				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> artificial				
15	<220>				
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff				
	<400> 165				
20		Arg	Glu	Gly	Gly
		1			5
	<210> 166				
	<211> 5				
25	<212> PRT				
	<213> artificial				
	<220>				
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff				
30	<400> 166				
		Leu	Thr	Lys	Asn
		1			5
	<210> 167				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> artificial				
40	<220>				
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff				
	<400> 167				
		Thr	Lys	Ala	Phe
45		1			5
	<210> 168				
	<211> 5				
	<212> PRT				
50	<213> artificial				
	<220>				
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff				
55	<400> 168				

ES 2 683 847 T3

		Trp Trp Leu Phe Gly
		1 5
5	<210> 169	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 169	
		Ile Lys Lys Lys Lys
		1 5
15	<210> 170	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 170	
25		Lys Trp Asn Lys Lys
		1 5
	<210> 171	
	<211> 5	
30	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
35	<400> 171	
		Lys Lys Lys Lys Lys
		1 5
40	<210> 172	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 172	
50		Thr Lys Gly Leu
		1
	<210> 173	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	

<400> 173

Tyr Lys Thr Lys Asp
1 5

5 <210> 174
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 174

Arg Lys Glu Lys Lys
1 5

15 <210> 175
<211> 5
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

25 <400> 175

Trp Trp Val Gly Gly
1 5

30 <210> 176
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 176

Trp Trp Arg Gly Gly
1 5

40 <210> 177
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 177

50 **Tyr Gly His Lys Tyr**
1 5

55 <210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 178

		Thr Lys Lys Glu Thr
5		1 5

<210> 179

<211> 5

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

15 <400> 179

	Thr Gly Gly Asn Lys
	1 5

<210> 180

20 <211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 180

	Leu Asp Gly Asp Gln
	1 5

30 <210> 181

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 181

40		Phe Ile Pro His Asn
		1 5

<210> 182

<211> 5

45 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

50 <400> 182

	Lys Lys Lys Gly Lys
	1 5

<210> 183

55 <211> 5

<212> PRT

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
5	<400> 183	
		Lys Asn Lys Lys Lys
		1 5
10	<210> 184	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 184	
		Lys Lys Lys Asn Asn
		1 5
20	<210> 185	
	<211> 5	
	<212> PRT	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
30	<400> 185	
		Lys Lys Lys Lys Arg
		1 5
35	<210> 186	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 186	
		Leu Lys Lys Lys Thr
		1 5
45	<210> 187	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 187	
55		
		Thr Lys Gly Arg Trp
		1 5

5	<210> 188 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	Lys Lys Lys Asn Lys 1 5
10	<400> 188	
15	<210> 189 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
20	<400> 189	
25		Lys His Ala Glu Thr 1 5
30	<210> 190 <211> 4 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA144ff	
35	<400> 190	Lys Lys Lys Lys 1
40	<210> 191 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
45	<400> 191	Phe Phe Thr Tyr Trp 1 5
50	<210> 192 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
55	<400> 192	

		Glu Gly Lys Arg Lys
		1 5
5	<210> 193	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 193	
		Arg His Gly Gly Trp
		1 5
15	<210> 194	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA144ff	
	<400> 194	
		Lys Ser Gly Tyr
25		1
	<210> 195	
	<211> 5	
30	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
35	<400> 195	
		Ala Lys Glu Gly Gly
		1 5
40	<210> 196	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 196	
		Lys Tyr Trp Met Ala
		1 5
50	<210> 197	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	

<400> 197

Gln Leu Arg Asn Lys
1 5

5 <210> 198
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 198

Gln Arg Gly Arg Met
1 5

15 <210> 199
<211> 5
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

25 <400> 199

Lys Asn His Asn Thr
1 5

30 <210> 200
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 200

Met Ser Glu Asn Glu
1 5

40 <210> 201
<211> 5
<212> PRT
45 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 201

50

Trp Trp Met Asp Tyr
1 5

55 <210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
5	<400> 202	
		Met Lys Lys Asn Lys
		1 5
10	<210> 203	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 203	
		Glu Tyr Phe Arg His
		1 5
20	<210> 204	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 204	
30		Phe Asp Met Arg Asp
		1 5
35	<210> 205	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 205	
		Met Lys Lys Pro Tyr
		1 5
45	<210> 206	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 206	
55		Phe Glu Met Pro Tyr
		1 5
	<210> 207	
	<211> 5	
	<212> PRT	

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
5	<400> 207	
		Lys Lys Lys Asn His
		1 5
10	<210> 208	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 208	
		Met Trp Glu Pro Ser
		1 5
20	<210> 209	
	<211> 5	
	<212> PRT	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 209	
30		
		Leu Arg Gly Ser Thr
		1 5
	<210> 210	
	<211> 5	
35	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
40	<400> 210	
		Asp Ser Tyr Met Ile
		1 5
45	<210> 211	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 211	
		Met Glu Gln His Ser
		1 5
55	<210> 212	

	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 212	
10		Lys Lys Lys Lys His 1 5
	<210> 213	
	<211> 5	
	<212> PRT	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
20	<400> 213	
		Asn Lys Lys Lys Lys 1 5
25	<210> 214	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 214	
35		Ile Met Asn Asp Trp 1 5
	<210> 215	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
	<400> 215	
45		Trp Thr Asn Gly Asp 1 5
	<210> 216	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
55	<400> 216	
		Trp Trp His Asp Met 1 5

5	<210> 217 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
10	<400> 217	Trp Glu Asn Pro His 1 5
15	<210> 218 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
20	<400> 218	Leu Tyr His Glu His 1 5
25	<210> 219 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 219	
35		Gly Gly Asp Gln His 1 5
40	<210> 220 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	
45	<400> 220	Ile Tyr Val Pro Tyr 1 5
50	<210> 221 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
55	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 221	

		Val Val Thr Ser Gln
		1 5
5	<210> 222 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
10	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 222	
		Trp Trp Asn Ser Lys
		1 5
15	<210> 223 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
20	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 223	
		Met Thr Gly Pro Gly
		1 5
25	<210> 224 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 224	
35		Asp Thr Tyr His Asp
		1 5
40	<210> 225 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
45	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff <400> 225	
		Gln Asp Glu Lys Thr
		1 5
50	<210> 226 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
55	<220> <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff	

<400> 226

Gly Asp His Arg Ile
1 5

5 <210> 227

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 227

Arg Asn Ser Asn Ser
1 5

15

<210> 228

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 228

25

Arg Glu Asn Thr Met
1 5

<210> 229

<211> 5

30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

35

<400> 229

Val Asn Asp Lys Met
1 5

40

<210> 230

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

45

<220>

<223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 230

Arg Lys Lys Asp Glu
1 5

50

<210> 231

<211> 5

<212> PRT

55

<213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

5 <400> 231

Ser Asn Ser Gly Tyr
1 5

10 <210> 232
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 232

Phe Glu Tyr Arg His
1 5

20 <210> 233
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 233

Arg Lys Lys Lys Lys
1 5

30 <210> 234
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

40 <400> 234

Tyr Gly Asn Ser Tyr
1 5

45 <210> 235
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff

<400> 235

Arg Asn Arg Lys Lys
1 5

55 <210> 236
 <211> 5
 <212> PRT

<213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 5 <400> 236
 Trp Asp His Gly Ser
 1 5
 <210> 237
 10 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 <400> 237
 Phe Ala Lys Arg Thr
 1 5
 20 <210> 238
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 <400> 238
 30 Ser Met Asp Lys Val
 1 5
 <210> 239
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle A-B AA143ff
 40 <400> 239
 Arg His Gln Asp Arg
 1 5
 45 <210> 240
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 240
 Ile Ser Gly Pro Glu
 1 5
 55 <210> 241
 <211> 5

	<212> PRT				
	<213> artificial				
	<220>				
5	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff				
	<400> 241				
		Asn	Gly	Gln	Pro
		1			5
10	<210> 242				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> artificial				
15	<220>				
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff				
	<400> 242				
20		Asp	Gly	Arg	Pro
		1			5
	<210> 243				
	<211> 5				
25	<212> PRT				
	<213> artificial				
	<220>				
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff				
30	<400> 243				
		Asp	Ala	Gly	Pro
		1			5
35	<210> 244				
	<211> 5				
	<212> PRT				
	<213> artificial				
40	<220>				
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff				
	<400> 244				
		Asn	Lys	Gln	Asn
45		1			5
	<210> 245				
	<211> 5				
	<212> PRT				
50	<213> artificial				
	<220>				
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff				
	<400> 245				
55		Asn	Met	Gly	Pro
		1			5
	<210> 246				

	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 246	
		Asp Cys Gly Pro Glu
10		1 5
	<210> 247	
	<211> 5	
	<212> PRT	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
20	<400> 247	
		Met Asp Gly Pro Glu
		1 5
	<210> 248	
25	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 248	
		Tyr Pro Glu Lys His
35		1 5
	<210> 249	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 249	
45		Asn Gly Ala Pro Gln
		1 5
	<210> 250	
	<211> 5	
50	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
55	<400> 250	
		Asp Tyr Gly Pro Met
		1 5

5	<210> 251 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	Arg Lys Lys Lys Glu 1 5
10	<400> 251	
15	<210> 252 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
20	<400> 252	
25		Lys Gly Gly Arg Glu 1 5
30	<210> 253 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
35	<400> 253	
40		Gly Asn Trp Gln Pro 1 5
45	<210> 254 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
50	<400> 254	
55		Thr Thr Gly Pro Tyr 1 5
	<210> 255 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 255	

ES 2 683 847 T3

		Asp Met Asn Gln Pro
		1 5
5	<210> 256 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
10	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 256	
		Lys Trp Pro Met Phe
		1 5
15	<210> 257 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
20	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 257	
		His Asp Gln Arg His
		1 5
25	<210> 258 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 258	
		Leu Gly Met Tyr Met
		1 5
40	<210> 259 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
45	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 259	
		Asn Lys Met Phe Thr
		1 5
50	<210> 260 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
55	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	

<400> 260

Leu Gly Tyr Pro Glu
1 5

5 <210> 261
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 261

His Gly Tyr Gln Leu
1 5

15 <210> 262
<211> 5
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

25 <400> 262

Asn Val Phe Ile Glu
1 5

30 <210> 263
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

35 <400> 263

Asn Arg Gly Trp His
1 5

40 <210> 264
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 264

Pro Phe Thr Leu Lys
1 5

50 <210> 265
<211> 5
<212> PRT
55 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 265

Ser Thr Thr Arg Val
1 5

5 <210> 266
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 266

Trp Asp Gln His Gln
1 5

15

<210> 267
<211> 5
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

25 <400> 267

Ser Gly Trp Met Met
1 5

30 <210> 268
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 268

Trp Arg Lys Met Thr
1 5

40 <210> 269
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 269

50

Phe Pro Lys Lys Tyr
1 5

55 <210> 270
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 270
 5
 Ser Pro Tyr Phe Val
 1 5
 <210> 271
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 15 <400> 271
 Ile Arg Gly Thr Ser
 1 5
 20 <210> 272
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 272
 Gln Val Pro Gly Trp
 1 5
 30 <210> 273
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 273
 40 Asp Leu Pro Tyr Gln
 1 5
 <210> 274
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 50 <400> 274
 Pro Arg Ser His Trp
 1 5
 55 <210> 275
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 275
 5
 Leu Tyr Gly His Ala
 1 5
 <210> 276
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 15 <400> 276
 Ala Pro Tyr Val His
 1 5
 20 <210> 277
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 277
 Arg Thr Gly Gln Lys
 30 1 5
 <210> 278
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 40 <400> 278
 Pro Thr Tyr Trp Tyr
 1 5
 45 <210> 279
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 279
 Glu Gly Met Glu Ile
 55 1 5
 <210> 280
 <211> 5
 <212> PRT

<213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 5
 <400> 280

 Pro Val Val Gly Ala
 1 5
 10
 <210> 281
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 15
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 281

 Pro Leu Met Val Asp
 1 5
 20
 <210> 282
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 282
 30
 Lys Tyr Gly Ser Gln
 1 5
 <210> 283
 <211> 5
 35
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 40
 <400> 283

 Arg Trp Asn Asn Gln
 1 5
 45
 <210> 284
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 <400> 284

 Val Tyr Lys Gln Asp
 1 5
 55
 <210> 285
 <211> 5

	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 285	
		Asn Gln Met Lys Phe
		1 5
10	<210> 286	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 286	
20		Asn His Gln His Thr
		1 5
	<210> 287	
	<211> 5	
25	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
30	<400> 287	
		Lys Arg Phe Val Asp
		1 5
35	<210> 288	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 288	
		His His Glu Pro Leu
		1 5
45	<210> 289	
	<211> 5	
	<212> PRT	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
55	<400> 289	
		Pro Lys Met Pro Tyr
		1 5

	<210> 290	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 290	
		Pro Lys Asp His Glu
10		1 5
	<210> 291	
	<211> 5	
	<212> PRT	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
20	<400> 291	
		Ala Lys Gly Ser Ile
		1 5
	<210> 292	
25	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 292	
		Glu Asp Pro Glu Met
35		1 5
	<210> 293	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 293	
45		
		Glu Phe Asp His Gln
		1 5
	<210> 294	
	<211> 5	
50	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
55	<400> 294	
		Asn Glu Lys Gln Asp
		1 5

5	<210> 295 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 295	Ala Pro His Tyr Tyr 1 5
10		
15	<210> 296 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 296	Pro Gln Leu His Leu 1 5
20		
25	<210> 297 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 297	Asn Trp Arg Ala Glu 1 5
30		
35	<210> 298 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 298	Asn Asn Gln Tyr Lys 1 5
40		
45		
50	<210> 299 <211> 4 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA170ff <400> 299	Arg Ser Ile His 1
55		

5	<210> 300 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 300	Arg Asp Arg Ile Met 1 5
10		
15	<210> 301 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 301	Tyr Gly Lys Gly His 1 5
20		
25	<210> 302 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 302	Gly Lys Gly Gly Lys 1 5
30		
35	<210> 303 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 303	Arg His Ile Gly Lys 1 5
40		
45	<210> 304 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 304	Gln Tyr Thr Tyr His 1 5
50		
55		

5	<210> 305 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
10	<400> 305	
		Leu His Ser His Val 1 5
15	<210> 306 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
20	<400> 306	
		Ala Arg Asp Lys Arg 1 5
25	<210> 307 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 307	
35		Glu His Lys Lys Thr 1 5
40	<210> 308 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
45	<400> 308	
		Met Asp Glu Val Pro 1 5
50	<210> 309 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
55	<400> 309	

		Gln Asp Trp Gln Arg
		1 5
5	<210> 310 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
10	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 310	
		Pro Ser Asp Arg Glu
		1 5
15	<210> 311 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
20	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 311	
		Gln Asn Thr Arg Trp
		1 5
25	<210> 312 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
30	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
35	<400> 312	
		Asp Glu Gly Leu His
		1 5
40	<210> 313 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
45	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 313	
		Trp Pro Asn Met Glu
		1 5
50	<210> 314 <211> 5 <212> PRT <213> artificial	
55	<220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff	

<400> 314

Met Thr Gly Arg Val
1 5

5 <210> 315
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 315

Gly Lys Tyr Asn Ile
1 5

15 <210> 316
<211> 5
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

25 <400> 316

Asn Ala Tyr Leu Leu
1 5

30 <210> 317
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 317

Ala Gln Tyr Asn Val
1 5

40 <210> 318
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 318

50

Asn Gln Val Met Thr
1 5

55 <210> 319
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

ES 2 683 847 T3

```

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

5 <400> 319

Val Val His Asp Thr
1 5

<210> 320
<211> 5
10 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff
15 <400> 320

Asn Ile Trp His Gln
1 5

20 <210> 321
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

25 <220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 321

Gln Trp Gly Asn Met
30 1 5

<210> 322
<211> 5
<212> PRT
35 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle CD AA169ff

40 <400> 322

Met His Val Lys Ser
1 5

45 <210> 323
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
50 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff

<400> 323

Glu Tyr Thr Val Val
55 1 5

<210> 324
<211> 5
<212> PRT

```

<213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 5 <400> 324

 Gly Pro Tyr Gln Asp
 1 5

 10 <210> 325
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

 15 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff

 <400> 325

 Gln Gly Val Leu Glu
 1 5
 20
 <210> 326
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff

 <400> 326
 30
 Gln Gln Pro Gly Val
 1 5

 <210> 327
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff
 40
 <400> 327

 Asn Gln Val Arg Gly
 1 5

 45 <210> 328
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

 50 <220>
 <223> Secuencia del bucle CD AA169ff

 <400> 328

 Val Pro His Val Leu
 1 5
 55
 <210> 329

	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 329	
10		Asp Gly Arg Lys Gln 1 5
	<210> 330	
	<211> 5	
	<212> PRT	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
20	<400> 330	
		Asn Ala Ser Phe Glu 1 5
25	<210> 331	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 331	
35		Lys Lys Arg Val Val 1 5
	<210> 332	
	<211> 5	
	<212> PRT	
40	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
45	<400> 332	
		Lys Gly Ile Lys Lys 1 5
50	<210> 333	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 333	
		Pro Met Gly Met Gly 1 5

5	<210> 334 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 334	
10		Pro Met Gly Lys Tyr 1 5
15	<210> 335 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 335	
20		Arg Gly Ile Ala Lys 1 5
25	<210> 336 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 336	
30		Leu Trp Gly Gly Met 1 5
35	<210> 337 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 337	
40		Asn Ala His Tyr Ile 1 5
45	<210> 338 <211> 5 <212> PRT <213> artificial <220> <223> Secuencia del bucle CD AA169ff <400> 338	
50		
55		

		Ser Gly Thr Arg Leu
		1 5
5	<210> 339	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia del bucle CD AA169ff	
	<400> 339	
		Asn Leu Gly Pro Glu
		1 5
15	<210> 340	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 340	
		Pro Gln Thr Pro Pro Ser Gln
25		1 5
	<210> 341	
	<211> 7	
30	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
35	<400> 341	
		Pro Pro Ser Pro Pro Arg Thr
		1 5
40	<210> 342	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 342	
		Pro Trp Val Arg Trp Met Gln
		1 5
50	<210> 343	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	

<400> 343

Ser Arg Ala Arg Trp Arg His
1 5

5 <210> 344
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
<220>
10 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 344

Ser Arg Ser Arg Trp Arg Gly
1 5

15 <210> 345
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
20 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 345

25 Pro Arg Trp Lys Met
1 5

<210> 346
<211> 12
30 <212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff
35

<400> 346

Lys Arg Tyr Asn Pro Arg Met Val Arg Trp Ala His
1 5 10

40 <210> 347
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 347

Pro Gln Ser Arg Trp Tyr Asn
1 5

50 <210> 348
<211> 7
<212> PRT
55 <213> artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 348

Pro Trp Ser Arg Trp Arg Leu
1 5

5 <210> 349
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 349

Pro Gln Lys Arg Trp Arg Ser
1 5

15 <210> 350
<211> 7
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

25 <400> 350

Pro Trp Val Arg Trp Leu Gln
1 5

30 <210> 351
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 351

Glu Leu Glu Gly Glu Glu Gln
1 5

40 <210> 352
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 352

50 Asn Arg Ser Arg Trp Gln Gln
1 5

55 <210> 353
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 353

Lys Lys Lys Lys Leu Lys Gln
1 5

5 <210> 354
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 354

Lys Lys Lys Gln Leu Lys Lys
1 5

15 <210> 355
<211> 9
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

25 <400> 355

Gln Gln Lys Lys Arg Lys Lys Lys Lys
1 5

30 <210> 356
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 356

Pro Pro Pro Leu Cys Ala Pro
1 5

40 <210> 357
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 357

Ser Leu Asn Arg Trp Lys Arg
1 5

55 <210> 358
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 358

	Lys Asn Lys Lys Lys Arg Lys
5	1 5

<210> 359

<211> 7

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 359

Lys Lys Lys Lys Ile Lys Lys
1 5

<210> 360

20 <211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

25 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 360

Lys Lys Lys Lys Met Lys Lys
1 5

30 <210> 361

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 361

40 <210> 362

Lys Arg Lys Lys Leu Lys Lys
1 5

<211> 7

45 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 362

Arg Glu Arg Glu Trp Arg Lys
1 5

<210> 363

55 <211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 363
 5
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 1 5
 <210> 364
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 15 <400> 364
 Pro Leu Arg Leu Pro Pro Met
 1 5
 20 <210> 365
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 365
 Pro Arg Ser Asn Trp Tyr Gly Asn Arg Trp Arg Arg
 1 5 10
 30 <210> 366
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 40 <400> 366
 Thr Pro Gly Asn Leu Ala Leu
 1 5
 45 <210> 367
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 367
 Ser Arg Glu Asp Phe Arg Ala
 1 5
 55 <210> 368
 <211> 7
 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

5 <400> 368

Leu Val Ser Ile Ser Val Gly
1 5

10 <210> 369
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 369

Pro Ser Arg Arg Trp Arg Glu
1 5

20 <210> 370
<211> 7
<212> PRT

25 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30 <400> 370

Asp Arg Arg Arg Trp Thr Ala
1 5

35 <210> 371
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40 <400> 371

Asp Leu Gln Asp Lys Lys Tyr
1 5

45 <210> 372
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

50 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 372

Ile Ser Val Pro Pro Asp Glu
1 5

55 <210> 373
<211> 7

<212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 373

 Thr Gly Pro Asp Ile Thr Val
 1 5
 10
 <210> 374
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 374
 20
 Ile Val Leu Ser Gly Phe Arg
 1 5

 <210> 375
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 30
 <400> 375

 Met Gly Ile His Asn Ile Asn
 1 5
 35
 <210> 376
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

 <400> 376

 Met Lys Gln Asp Glu Met Ala
 1 5
 45
 <210> 377
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> artificial

 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 55
 <400> 377

 Pro Gln Trp Arg Leu Gln Trp
 1 5

<210> 378
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 378
 10
 His Arg Arg Leu Val Ala Arg
 1 5
 <210> 379
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 20
 <400> 379
 Lys Gln Asn Leu Arg Arg Lys
 1 5
 25 <210> 380
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 380
 Ser Arg Ser Arg Leu His Gly Asn Arg Trp Arg Arg
 1 5 10
 35 <210> 381
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 381
 45
 Asn Arg Glu Arg Trp Arg Arg
 1 5
 <210> 382
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 55
 <400> 382
 Thr Trp Val Arg Trp Met Gln
 1 5

<210> 383
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 383
 10
 Pro His Trp Gln Trp Lys Trp
 1 5
 <210> 384
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 20 <400> 384
 Ser Lys Lys Lys Leu Arg Lys
 1 5
 25 <210> 385
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 385
 Pro Trp Lys Arg Leu Arg Lys
 1 5
 35 <210> 386
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 45 <400> 386
 Thr Gln Lys Arg Trp Arg Ser
 1 5
 50 <210> 387
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 387

		Asn Arg Lys His Leu Arg Ala
		1 5
5	<210> 388	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
10	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 388	
		Thr Arg Arg Arg Trp Thr Arg
		1 5
15	<210> 389	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 389	
		Asp His Arg Arg Ile Asn Arg
25		1 5
	<210> 390	
	<211> 7	
30	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
35	<400> 390	
		Lys Lys Lys Lys Tyr His Lys
		1 5
40	<210> 391	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 391	
		Gln Lys Lys Lys Leu Lys Lys
		1 5
50	<210> 392	
	<211> 7	
	<212> PRT	
55	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	

<400> 392

Pro Gln Lys Lys Leu Arg Lys
1 5

5 <210> 393
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

10 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 393

Asp Lys Arg Gly Ile Arg Lys
1 5

15 <210> 394
<211> 7
<212> PRT
20 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

25 <400> 394

Glu Lys Lys Arg Trp Lys Glu
1 5

30 <210> 395
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

35 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 395

Thr Ser Arg Arg Trp Arg Glu
1 5

40 <210> 396
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

45 <220>
<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 396

50

Lys Lys Glu Lys Leu Arg Lys
1 5

55 <210> 397
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 397

5 Lys Lys Lys Lys Leu Lys Lys
1 5

<210> 398

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

10 <213> artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 398

Lys Lys Lys Lys Ile Met Lys
1 5

<210> 399

20 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> artificial

 $\langle 220 \rangle$

25 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 399

Asp Gln Thr Arg Trp Arg Arg
1 5

30

<210> 400

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> artificial

35

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 400

40

Lys Lys Lys Glu Ile Lys Lys
1 5

<210> 401

 $\langle 211 \rangle$ 7

45 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50

<400> 401

Lys Lys Asn Lys Leu Lys Lys
1 5

55 $\langle 210 \rangle$ 402

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 402

5

Pro Trp Trp Gln Phe Arg Gln
 1 5

<210> 403
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

15 <400> 403

Asp Gln Ser Lys Leu Ser Ser Leu Arg Trp Lys Lys
 1 5 10

20 <210> 404
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 404

30 Pro Asn Glu Lys Leu Lys Lys
 1 5

<210> 405
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

40 <400> 405

Pro Leu Ser Arg Trp Lys Arg
 1 5

45 <210> 406
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

50 <400> 406

Thr Gln Asn Gln Ile Lys Lys
 1 5

55 <210> 407
 <211> 7
 <212> PRT

<213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 5 <400> 407
 Asp Arg Glu Arg Trp Arg Arg
 1 5
 10 <210> 408
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 408
 Ala Arg Ser Arg Trp Arg Lys
 1 5
 20 <210> 409
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 409
 30 <210> 410
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 40 <400> 410
 Lys Asn Lys Lys Arg Lys Lys
 1 5
 45 <210> 411
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 411
 Asn Thr Lys Lys Leu Lys Lys
 1 5
 55 <210> 412
 <211> 7

<212> PRT
<213> artificial

$\langle 220 \rangle$

5 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 412

Asn Arg Lys Arg Ile Arg Lys
1 5

10

<210> 413

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> artificial

15

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 413

20

Ser Arg Lys Arg Phe Arg Ser
1 5

<210> 414

 $\langle 211 \rangle$ 7

25

<212> PRT

<213> artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

30

<400> 414

Pro Phe Arg Arg Trp Val Lys
1 5

35

<210> 415

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> artificial

40

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

<400> 415

Asn Lys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5

45

<210> 416

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

50

<213> artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia del bucle EF AA198ff

55

<400> 416

Asn Gly Lys Arg Leu His Ser
1 5

<210> 417
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 417
 10
 Pro Lys Trp Leu Trp His Gln
 1 5
 <210> 418
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 20 <400> 418
 Pro Trp Trp Lys His His Val
 1 5
 25 <210> 419
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 419
 Pro Asn Trp Lys Tyr Gln Trp
 1 5
 35 <210> 420
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 45 <400> 420
 Pro Gln Arg Lys Val Ala Pro
 1 5
 50 <210> 421
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia del bucle EF AA198ff
 <400> 421

		Pro Trp Tyr Lys Val Leu Met
		1 5
5	<210> 422	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 422	
		Asp Arg Lys Trp Trp Thr Phe
		1 5
15	<210> 423	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 423	
		Pro Arg His Glu Trp Val Met
25		1 5
	<210> 424	
	<211> 7	
	<212> PRT	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
35	<400> 424	
		Pro Trp Ser Arg Trp Met Gln
		1 5
40	<210> 425	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 425	
		Ser Arg Ala Arg Trp Leu His
		1 5
50	<210> 426	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> artificial	
	<220>	
55	<223> Secuencia del bucle EF AA198ff	
	<400> 426	

ES 2 683 847 T3

Asn Arg Ser Arg Leu His Gly Asn Arg Trp Arg Arg
1 5 10

<210> 427
<211> 5473
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Plásmido pYD1dX_dCH1dCH3_Fcab_wt

<400> 427

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgccg actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac	180
ctggcccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtTTTTT agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc	360

ggtttgtatt acttcttatt caaatgtaat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatatac 420
 ctctatactt taacgtcaag gagaaaaaac cccggatcgg actactagca gctgtaatac 480
 gactcactat agggaaatatt aagctaattc tacttcatac attttcaatt aagatgcagt 540
 tacttcgctg tttttcaata ttttctgtta ttgcttcagt tttagcacag gaactgacaa 600
 ctatatgcga gcaaatcccc tcaccaactt tagaatcgac gccgtactct ttgtcaacga 660
 ctactatttt ggccaacggg aaggcaatgc aaggagtttt tgaatattac aaatcagtaa 720
 cgtttgtcag taattgcggt tctcaccct caacaactag caaaggcagc ccataaaca 780
 cacagtatgt ttttaagctt ctgcaggcta gtggtggtgg tggttctggt ggtggtggtt 840
 ctggtggtgg tggttctgct agcatgactg gtggacagca aatgggtcgg gatctgtacg 900
 acgatgacga taaggtaacca ggatccgagc ccaagagcag cgacaagaca cacacgtgtc 960
 ccccatgtcc cgccctgag ctgctgggag gcccttcctg ttctctgttc cctcccaagc 1020
 caaaggacac cctgatgatc tcccggaacc ctgaggtgac ctgtgtggtg gtggacgtga 1080
 gccacgagga ccagaggtg aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcacaacg 1140
 ccaagaccaa gcctagagag gagcagtaca acagcaccta ccgcgtggtg agcgtgctga 1200
 ccgtgctgca ccaggattgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaagggt agcaacaagg 1260
 ccctgctgc ccccatcgag aagaccatct ccaaggcaa gggccagcct cgagaaggta 1320
 agcctatccc taaccctctc ctcggtctcg attctacgag taccggtcat catcaccatc 1380
 accattgagt ttaaacccgc tgatctgata acaacagtgt agcgccgct cgatcgagtc 1440
 tagagggccc ttcgaaggta agcctatccc taaccctctc ctcggtctcg attctacgag 1500
 taccggtcat catcaccatc accattgagt ttaaacccgc tgatctgata acaacagtgt 1560
 agatgtaaca aaatcgactt tgttccact gtacttttag ctcgtaacaa atacaatata 1620
 cttttcatth ctccgtaaac aacatgtttt cccatgtaat atccttttct atttttcgth 1680
 ccgttaccaa ctttacacat actttatata gctattcact tctatacact aaaaaactaa 1740
 gacaatttta attttgctgc ctgccatatt tcaatttgth ataaattcct ataatttatc 1800
 ctattagtag ctaaaaaaag atgaatgtga atcgaatcct aagagaattg ggcaagtgca 1860
 caaacaatac ttaaataaat actactcagt aataacctat ttcttagcat ttttgacgaa 1920
 atttgctatt ttgttagagt cttttacacc atttgtctcc acacctccgc ttacatcaac 1980
 accaataaag ccatttaate taagcgcatc accaacattt tctggcgta gtccaccagc 2040
 taacataaaa tgtaagctct cggggctctc ttgccttcca acccagtcag aaatcgagth 2100
 ccaatccaaa agttcacctg tcccaactgc ttctgaatca aacaaggga taaacgaatg 2160
 aggtttctgt gaagctgcac tgagtagtat gttgcagth tttggaaata cgagthttt 2220

aataactggc aaaccgagga actcttggtg ttcttgccac gactcatctc cgtgcagttg	2280
gaogatatca atgccgtaat cattgaccag agccaaaaca tcttccttag gttgattacg	2340
aaacacgcca accaagtatt tcggagtgcc tgaactatct ttatatgctt ttacaagact	2400
tgaaatcttc cttgcaataa ccgggtcaat tgttctcttt ctattgggca cacatataat	2460
accagcaag tcagcatcgg aatctagagc acattctgcg gcctctgtgc totgcaagcc	2520
gcaaaacttc accaatggac cagaactacc tgtgaaatta ataacagaca tactccaagc	2580
tgcctttgtg tgcttaatac cgtatactca cgtgctcaat agtcaccaat gccctccctc	2640
ttggccctct ccttttcttt ttctgaccca atttcttgaa gacgaaaggc cctcgtgata	2700
cgcctatctt tatagggtta tgcctatgata ataattggtt cttaggacgg atcgtctgcc	2760
tgtaacttac acgcgcctcg tatcttttaa tgatggaata atttggaat ttactctgtg	2820
tttatttatt tttatgtttt gtatttggat tttagaaagt aaataaagaa ggtagaagag	2880
ttacggaatg aagaaaaaaa aataaacaaa ggtttaaaaa atttcaacaa aaagcgtact	2940
ttacatatat atttattaga caagaaaagc agattaaata gatatacatt cgattaacga	3000
taagtaaaat gtaaaatcac aggatcttcg tgtgtggtct tctacacaga caagatgaaa	3060
caattcggca ttaataacct agagcaggaa gagcaagata aaaggtagta tttgttggcg	3120
atccccctag agtcttttac atcttcggaa aacaaaaact atttttctt taatttcttt	3180
ttttactttc tatttttaat ttatatattt atattaaaaa atttaaatta taattatttt	3240
tatagcacgt gatgaaaagg acccaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	3300
tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	3360
ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	3420
ccttattccc ttttttgcgg catcttgcct tctgtttttt gctcaccag aaacgctggg	3480
gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct	3540
caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac	3600
ttttaaaagt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgtt gacgccgggc aagagcaact	3660
cggctgcgcg atacactatt ctccagaatga cttgggttag tactcaccag tcacagaaaa	3720
gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccattgagtga	3780
taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt	3840
tttgacaaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga	3900
agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg	3960
caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat	4020
ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcgcc cttccggctg gctggtttat	4080
tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc	4140

agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg ggcagtcagg caactatgga 4200
 tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc 4260
 agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttataaa cttcattttt aatttataaag 4320
 gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgacccaaa atcccttaac gtgagttttc 4380
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 4440
 tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaaccg ctaccagcgg tggtttgttt 4500
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca ggcgcagat 4560
 accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 4620
 accgcctaca tacctcgctc tgctaatact gttaccagtg gctgctgccg gtggcgataa 4680
 gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 4740
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 4800
 atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaga aggcggacag 4860
 gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc caggggggaa 4920
 cgcctggat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 4980
 gtgatgctcg tcaggggggc cgagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg 5040
 gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgtttctt cctgcgttat cccctgattc 5100
 tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 5160
 cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 5220
 cccgcgcgct tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 5280
 gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttacctcact cattaggcac ccagagcttt 5340
 acactttatg cttccggctc ctatgttgtg tggaattgtg agcgggataa aatttcacac 5400
 aggaaacagc tatgaccatg attacgcca gctcggaatt aaccctcact aaagggaaca 5460
 aaagctggct agt 5473

<210> 428
 <211> 5677
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> PYD1dX_dCH1_Fcab_wt

<400> 428

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt 60
 cctcgtcttc accggtcgcg ttctgaaac gcagatgtgc ctcgcgccgc actgctccga 120
 acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac 180

ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtTTTTT	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttaa	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagtgaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggatcgg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	aggggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaattccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatTTT	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagTTTT	tgaatattac	aatcagtaa	720
cgtttgtcag	taattgcggg	tctcaccctt	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtgggtgggtg	tggttctggg	ggtgggtgggt	840
ctgggtgggtg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccgagc	ccaagagcag	cgacaagaca	cacacgtgtc	960
ccccatgtcc	cgccctgag	ctgctggggg	gcccttcctg	gttcctgttc	cctcccaagc	1020
caaaggacac	cctgatgatc	tcccggaccc	ctgaggtgac	ctgtgtgggtg	gtggacgtga	1080
gccacgagga	cccagagggtg	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	1140
ccaagaccaa	gcctagagag	gagcagtaca	acagcaccta	ccgcgtgggtg	agcgtgctga	1200
ccgtgctgca	ccaggattgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtg	agcaacaagg	1260
ccctgcctgc	ccccatcgag	aagaccatct	ccaaggccaa	gggccagcct	cgagaaccac	1320
aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccagggtc	agcctgacct	1380
gcctgggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	aatgggcagc	1440
cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	cgacggctcc	ttcttctctt	1500
acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcattgctccg	1560
tgatgcatga	ggctctgcac	aaccaactaca	cacagaagag	cctctccctg	tctccgggtta	1620
aatgagcggc	cgctcgatcg	agtctagagg	gcccttcgaa	ggtaagccta	tccctaacc	1680
tctcctcggt	ctcgattcta	cgcgtaccgg	tcatcatcac	catcaccatt	gagtttaaac	1740
ccgctgatct	gataacaaca	gtgtagatgt	aacaaaatcg	actttgttcc	cactgtactt	1800
ttagctcgta	caaaatacaa	tatacttttc	atttctccgt	aaacaacatg	ttttcccatg	1860
taatatacct	ttctatTTTT	cgttccgtta	ccaactttac	acatacttta	tatagctatt	1920
cacttctata	cactaaaaaa	ctaagacaat	tttaattttg	ctgcctgcca	tattttcaatt	1980
tggtataaat	tcctataatt	tatcctatta	gtagctaaaa	aaagatgaat	gtgaatcgaa	2040
tcctaagaga	attgggcaag	tgacacaaaca	atacttaaat	aaatactact	cagtaataac	2100

ctattttctta gcatttttga cgaaatttgc tatttttgta gagtctttta caccatttgt 2160
 ctccacacct ccgcttacat caacaccaat aacgccattt aatctaagcg catcaccaac 2220
 attttctggc gtcagtccac cagctaacat aaaatgtaag ctctcggggc tctcttgcc 2280
 tccaaccag tcagaaatcg agttccaatc caaaagttca cctgtcccac ctgcttctga 2340
 atcaaacaag ggaataaacg aatgaggttt ctgtgaagct gcactgagta gtatgttgca 2400
 gtcttttgga aatacgagtc ttttaataac tggcaaaccg aggaactctt ggtattcttg 2460
 ccacgactca tctccgtgca gttggacgat atcaatgccg taatcattga ccagagccaa 2520
 aacatcctcc ttaggttgat tacgaaacac gccaaccaag tatttcggag tgcctgaact 2580
 atttttatat gcttttacia gacttgaaat tttccttgca ataaccgggt caattgttct 2640
 ctttctattg ggcacacata taatacccag caagtcagca tcggaatcta gagcacattc 2700
 tgcggcctct gtgctctgca agccgcaaac tttcaccaat ggaccagaac tacctgtgaa 2760
 attaataaca gacatactcc aagctgcctt tgtgtgctta atcacgtata ctcaogtgct 2820
 caatagtcac caatgccttc cctcttgccc ctctcctttt ctttttttga ccgaatttct 2880
 tgaagacgaa agggcctcgt gatacgcta tttttatagg ttaatgtcat gataataatg 2940
 gtttcttagg acggatcgct tgccgtgaac ttacacgccc ctcgatctt ttaatgatgg 3000
 aataatttgga gaatttactc tgtgtttatt tatttttatg ttttgtattt ggattttaga 3060
 aagtaaataa agaaggtaga agagttacgg aatgaagaaa aaaaaataaa caaaggttta 3120
 aaaaatttca acaaaaagcg tactttacat atatatatat tagacaagaa aagcagatta 3180
 aatagatata cattcgatta acgataagta aaatgtaaaa tcacaggatt ttcgtgtgtg 3240
 gtcttctaca cagacaagat gaaacaattc ggcattaata cctgagagca ggaagagcaa 3300
 gataaaagggt agtatttggt ggcgatcccc ctagagtctt ttacatcttc ggaaaacaaa 3360
 aactattttt tctttaattt ctttttttac tttctatttt taatttatat atttatatta 3420
 aaaaatttaa attataatta tttttatagc acgtgatgaa aaggaccag gtggcacttt 3480
 tcgggggaaat gtgcgcgga cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta 3540
 tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat 3600
 gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt 3660
 ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg 3720
 agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga 3780
 agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg 3840
 tgttgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgaattggg 3900
 tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg 3960

cagtgtctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcgggccaac ttactttctga caacgatcgg 4020
 aggaccgaag gagctaaccg ctttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgcgcttga 4080
 tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc 4140
 tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc 4200
 ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgogctc 4260
 ggcccttcog gctggctggt ttattgctga taaatctgga gcgggtgagc gtgggtctcg 4320
 cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac 4380
 gacgggcagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc 4440
 actgattaag catttgtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt 4500
 aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac 4560
 caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccocgtag aaaagatcaa 4620
 aggatcttct tgagatcctt tttttctgog cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc 4680
 accgctacca gcgggtggtt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt 4740
 aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg 4800
 ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa tctgttacc 4860
 agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaaccggg ttggactcaa gacgatagtt 4920
 accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga 4980
 gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag cattgagaaa gcgcacgct 5040
 tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg 5100
 cacgaggag cttccagggg ggaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca 5160
 cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgctcagg gggccgagcc tatggaaaaa 5220
 cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgtt 5280
 ctttctgog ttatccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga 5340
 taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga 5400
 gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggcgg attcattaat gcagctggca 5460
 cgacagggtt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg tgagttacct 5520
 cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttcog gctcctatgt tgtgtggaat 5580
 tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac catgattacg ccaagctcgg 5640
 aattaaccct cactaaaggg aacaaaagct ggctagt 5677

<210> 429
 <211> 19
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Cebador CH3seqs/2
 5 <400> 429
 aaggagtaca agtgcaagg 19
 <210> 430
 <211> 16
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador CDmut_back
 15 <400> 430
 gctctccac tccacg 16
 <210> 431
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador EFmut_back
 25 <400> 431
 cacggtgagc ttgctgtaga g 21
 30 <210> 432
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador ABMUT5/2_back
 <400> 432
 ctcaccccg gatggg 16
 40 <210> 433
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> Cebador CDmut5cod_for
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <222> (16)..(30)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 433
 55 gtggagtgagg agagcnnnnn nnnnnnnnnn aacaactaca agaccacg 48
 <210> 434
 <211> 54
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador EFMUT7cod_for

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(36)
 <223> n es a, c, g o t
 5
 <400> 434
 agcaagctca cctggnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnggga acgtcttctc atgc 54
 <210> 435
 10 <211> 54
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Cebador EFMUT3+2_for
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(24)
 20 <223> n es a, c, g o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(36)
 25 <223> n es a, c, g o t
 <400> 435
 agcaagctca cctggnnnnn nnnnagggtgg nnnnnnggga acgtcttctc atgc 54
 30 <210> 436
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> artificial
 35 <220>
 <223> Cebador ABMUT5 (wt)_for
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (16)..(30)
 <223> n es a, c, g o t
 <400> 436
 ccatcccgga atgagnnnnn nnnnnnnnnn gtcagcctga cctgcctgg 49
 45 <210> 437
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> Cebador CH3seqAS
 <400> 437
 55 tagaatcgag accgagg 17
 <210> 438
 <211> 19
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador YCH3.25rec.opt.for
 65 <400> 438

accatctcca aggccaagg 19

<210> 439

<211> 18

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador Ych3.25rec.back

10 <400> 439

aagggccctc tagactcg 18

15

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo modular citotóxico con un peso molecular de hasta 60 kD, que comprende un dominio CH2 y un dominio CH3 de una cadena pesada de IgG1 humana y que se une específicamente a un receptor humano de la clase erbB con una afinidad de unión de $K_d < 10^{-8}$ M, en donde el anticuerpo contiene un sitio de unión para el receptor de la clase erbB en una región de bucle estructural del dominio CH3 del anticuerpo y en donde el anticuerpo modular citotóxico se une al receptor de Fc humano CD64, FcRn y/o proteína A.
- 2 El anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une al receptor de Fc humano CD64.
3. El anticuerpo modular de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo se une al receptor FcRn humano.
4. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo se une a la proteína A.
5. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo modular es un homodímero.
6. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene actividad apoptótica.
7. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho receptor de la clase erbB se selecciona del grupo que consiste en EGFR HER2, HER2NEU, HER3 Y HER4.
8. El anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho receptor de la clase erbB es Her2.
9. Una molécula de anticuerpo completa que comprende un anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicho anticuerpo es una inmunoglobulina humana.
11. La molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho anticuerpo es una IgG1 humana.
12. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo modular es parte de una proteína de fusión en la que un dominio del anticuerpo modular se fusiona a una o más de otras proteínas.
13. El anticuerpo modular de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la proteína fusionada al anticuerpo modular se selecciona del grupo que consiste en otros anticuerpos modulares, inmunoglobulinas, ligandos, proteínas de armazón, enzimas y toxinas.
14. El anticuerpo modular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 12 a 13 o la molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para su uso en el tratamiento de un paciente que sufre un tumor sólido, tumor que expresa un receptor de la clase erbB.

Figura 1:

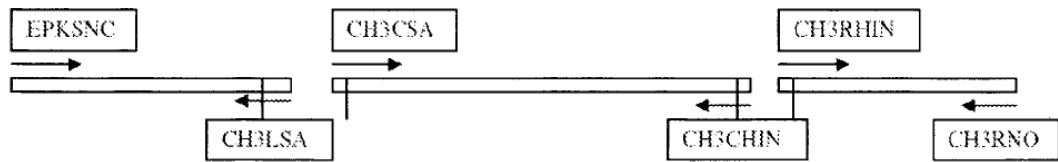


Figura 3 (SEC ID N° 1): estructura cristalina de un fragmento Fc de IgG1

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

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

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

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

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

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

gacgaaagg	cctcgtgata	cgcctatttt	tataggttaa	tgtcatgata	ataatgggtt	60
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	tggtttatttt	120
tctaaatata	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttcgg	tgtcgccctt	attccctttt	240
ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaaat	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctc	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	cggggcaaga	gcaactcggt	cgccgcatac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtct	ccataaccat	gagtataaac	actgcccaca	600
acttacttct	gacaacgatc	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgccct	gatcgttggt	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttatttgt	gataaatctg	900
gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
cccgatcatg	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catataactt	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaactc	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccg	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgtg	gctgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
ggttggtact	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	ggagaaaagg	ggacaggtat	ccggttaagc	1680
gcagggtcgg	aaaggagag	cgcacgaggg	agcttcacag	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740

atagtcctgt	cgggttttgc	cacctctgac	ttgagcgctg	atTTTTgtga	tgctcgtcag	1800
gggggaggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgcagagt	ttcccagactg	gaaagcgggc	agtgcgagca	2100
acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggctcgat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagcct	aagcttgcat	gcaaattcta	tttcaaggag	acagtcataa	2280
tgaaataacct	attgcctacg	gcagccgctg	gattgttatt	actcgcggcc	cagccggcca	2340
tgcccgagcc	caaactctgt	gacaaaactc	acacatgccc	accgtgccca	gcacctgaac	2400
tcctgggggg	accgtcagtc	ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	2460
cccggaaccc	tgaggtcaca	tgctgtgtgg	tgagcgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	2520
agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	2580
agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtgtgca	gcgtccctac	cgctctgcac	caggactggc	2640
tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggctc	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	2700
aaacatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	2760
cccggaatga	gctgaccaag	aaccagggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	2820
ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	2880
cgctcccgt	cttggaactcc	gacggctcct	tccttctcta	cagcaagcct	accgtgggtt	2940
gccgcgggtga	ttgtctgagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tcctgtatgc	3000
atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaagcgg	3060
ccgcagaaca	aaaactcatc	tcagaagagg	atctgaatgg	ggccgcatag	actgttgaaa	3120
gttgttttagc	aaaacctcat	acagaaaatt	catttactaa	cgtctggaaa	gacgacaaaa	3180
cttttagctg	ttacgctaac	tatgagggtc	gtctgtggaa	tgctacaggc	gttgtgtgtt	3240
gtactgggtga	cgaaactcag	tgttacggta	catgggttcc	tattgggctt	gctatccctg	3300
aaaatgaggg	tggtggtctc	gaggggtggc	gttctgaggg	tgccggttct	gaggggtggc	3360
gtactaaacc	tcctgagtac	ggtgatacac	ctattccggg	ctatacttat	atcaaccctc	3420
tcgacggcac	ttatccgcct	ggtactgagc	aaaaccccg	taatccta	ccttctcttg	3480
aggagtctca	gcctctta	actttcatgt	ttcagaataa	taggttccga	aataggcagg	3540
gtgcattaac	tgttttatag	ggcactgtta	ctcaaggcac	tgaccccggt	aaaacttatt	3600
accagtacac	tcctgtatca	tcaaaagcca	tgatgatgac	ttactgggaa	ggtaaattca	3660
gagactgccc	tttccattct	ggctttaatg	aggatccatt	cgtttgtgaa	tatcaaggcc	3720
aatcgtctga	cctgcctcaa	cctcctgtca	atgctggcgg	cgctctggt	ggtggttctg	3780
gtggcggtc	tgaggggtgg	ggctctgagg	gtggcggttc	tgaggggtgg	ggctctgagg	3840
gtggcggttc	cggtgcggg	tcgggttccg	gtgattttga	ttatgaaaaa	atggcaaacg	3900
ctaataaggg	ggctatgacc	gaaaatgccg	atgaaaacgc	gctacagctc	gacgctaaag	3960
gcaaacttga	ttctgtcgct	actgattacg	gtgctgctat	cgatgggttc	attggtgacg	4020
ttccggcct	tgctaatggt	aatgggtgct	ctggtgattt	tgctggctct	aattcccaaa	4080
tggtcgaagt	cggtgacgg	gataattcac	ctttaatgaa	taatttccgt	caatattttac	4140
cttctttgcc	tcagtcggtt	gaatgtcgcc	cttatgtctt	tgccgctggt	aaacatattg	4200
aattttctat	tgattgtgac	aaaataaaact	tattccgtgg	tgcttttgcg	tttcttttat	4260
atgttgccac	ctttatgtat	gtattttcga	cgtttgctaa	catactgcat	aaggagctct	4320
aataagaatt	cactggccgt	cgttttacaa	cgctgctgact	gggaaaaccc	tgccgttacc	4380
caacttaate	gccttgacgc	acatccccct	ttcgccagct	ggcgtaatag	cgaagaggcc	4440
cgcaccgatc	gcccttccca	acagttgccc	agcctgaatg	gcgaatggcg	cctgatggcg	4500
tattttctcc	ttacgcactc	gtgcgggtatt	tcacaccgca	cgtcaaagca	accatagtac	4560
gcgcctgtga	gcgccgcatt	aagcgcggcg	ggtgtgtgtg	ttacgcgcag	cgtgaccgct	4620
acacttgcca	gcgcctagc	gcccgctcct	ttegctttct	tccttccctt	ctcgcgccag	4680
ttcgccggct	ttccccgtca	agctctaaat	cgggggctcc	ctttagggtt	ccgatttagt	4740
gctttacggc	acctcgaccc	caaaaaactt	gattttgggtg	atggttcacg	tagtgggcca	4800
tcgccttgat	agacggtttt	tcgccttttg	acgttggagt	ccacgttctt	taatagtggg	4860
ctcttggttc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	gctattcttt	tgattttataa	4920
gggattttgc	cgatttcggc	ctattgggtt	aaaaatgagc	tgattttaaca	aaaatttaac	4980
gcgaatttta	acaaaatatt	aacgtttaca	attttatggt	gcactctcag	tacaatctgc	5040
tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	caccgcgcaa	caccgcgtga	cgcgcctga	5100
cgggcttgct	tgctcccgcc	atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	5160
atgtgtcaga	ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga			5200

Fig. 7 (SEQ ID N° 14): vector pHENFcabRGD4L

gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatfff	tatagggttaa	tgatcatgata	ataatgggttt	60
cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	tggttatffff	120
tctaaatata	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
aataattgaaa	aaggaagagt	atgagtatcc	aacattttccg	tgatcgccctt	attccctttt	240
ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	accagaaaac	gctggtgaaa	gtaaaagatg	300
ctgaagatca	gttgggtgca	cgaagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	360
tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctgc	420
tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	480
actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
gcatgacagt	aagagaatta	tgcatgtctg	ccataacat	gagtataaac	actgcggcca	600
acttacttct	gacaacgata	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggaacaaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
cggaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcgggataaa	840
ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggtgtgctg	gtttattgct	gataaatctg	900
gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggttaagccct	960
cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
agatcgctga	gatagggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
catatactact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
tcctttttga	taatctcatg	accaaatacc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	ttttttctg	cgcgtaattc	1260
gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgt	ttgtttgccc	gatcaagagc	1320
taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
ttctagtgtg	gcccgtagtt	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
gggttgactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaa	ggagaaaagg	ggacagggtat	ccggtaagcg	1680
gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
atagtccgtg	cgggttttcg	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttggtg	tgctcgtcag	1800
ggggggcgag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860
gctggccttt	tgctcacatg	ttctttctcg	cggtatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt	1980
cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaact	gaaagcgggc	agttagcgca	2100
acgcaattaa	tgtaggttag	ctcactcatt	aggcaccoca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
cggtcgttat	gttggttgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
accatgatta	cgccaagctt	aagcttgcat	gcaaatctta	tttcaaggag	acagtcataa	2280
tgaaatacct	attgcctacg	gcagccgctg	gattgttatt	actcgcggcc	cagccggcca	2340
tgcccgagcc	caaactctgt	gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaac	2400
tcctgggggg	accgtcagtc	ttctcttccc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	2460
cccggaaccc	tgaggtcaca	tgctgtgggt	tggaagtgag	ccacgaagac	cctgagttca	2520
agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgataaatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	2580
agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	2640
tgatggcaa	ggagtacaag	tgcaagggtc	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	2700
aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	2760
cccgggatga	gctgaccaag	aaccaggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	2820
ccagcgacat	gcgcgtggag	tggaagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	2880
cgcctcccgt	gctggactcc	gacggctcct	ttctctctca	cagcaagctt	accgtgggtt	2940
gccgcgggtg	ttgtctgagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	3000
atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggttaaggagg	3060
gtggtggctc	tgccggccga	gaacaaaaac	tcattctcaga	agaggatctg	aatggggccg	3120
catagactgt	tgaaagtgtg	ttagcaaaaac	ctcatacaga	aaattcattt	actaacgtct	3180
ggaaagacga	caaaaacttta	gatcgttacg	ctaactatga	gggtctgtct	tggaatgcta	3240
caggcggttg	ggtttgtact	ggtgacgaaa	ctcagtgtta	cggtacatgg	gttctctatt	3300
ggcttgctat	ccctgaaaat	gaggggtggg	gctctgaggg	tgccgggtct	gaggggtggc	3360
gttctgaggg	tgccgggtact	aaacctcctg	agtagcgtga	tacacctatt	ccgggctata	3420
cttatatcaa	ccctctcgac	ggcaattatc	cgctgggtac	tgagcaaaac	ccgcctaata	3480
ctaatacctc	tcttgaggag	ttcagccttc	tttaactttt	catgtttcag	aataatagg	3540
tccgaaatag	gcagggtgca	tttaactgtt	atacgggcac	tggtactcaa	ggcactgacc	3600
ccgttaaaaac	ttattaccag	tacactcctg	tatcatcaaa	agccatgtat	gacgcttact	3660

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

ggaacggtaa	attcagagac	tgcgctttcc	attctggttt	taatgaggat	ccattcggtt	3720
gtgaatatca	aggccaatcg	tctgacctgc	ctcaacctcc	tgtcaatgct	ggcggcggtc	3780
ctggtggtgg	ttctggtggc	ggctctgagg	gtggcggtcc	tgagggtggc	ggttctgagg	3840
gtggcggtcc	tgagggtggc	ggttccggtg	gcggctccgg	ttccggtgat	tttgattatg	3900
aaaaaatggc	aaacgctaata	aaggggggcta	tgaccgaaaa	tgccgatgaa	aacgcgctac	3960
agctctgacgc	taaaggcaaa	cttgattctg	tcgctactga	ttacggtgct	gctatcgatg	4020
gtttcattgg	tgacgtttcc	ggccttgcta	atggtaatgg	tgctactggg	gattttgctg	4080
gctctaattc	ccaaatggct	caagtcgggtg	acgggtgataa	ttcaccttta	atgaataatt	4140
tccgtcaata	tttaccttct	ttgcctcagt	cgggttgatg	tcgcccttat	gtctttggcg	4200
ctggtaaacc	atatgaattt	tctattgatt	gtgacaaaa	aaactttatc	cgtggtgtct	4260
ttgcgtttct	tttatatgtt	gccaccttta	tgtatgtatt	ttcgacgttt	gctaacatac	4320
tgcataagga	gtcttaataa	gaattcactg	gccgtcggtt	tacaacgtcg	tgactgggaa	4380
aacctgtagg	ttaccctact	taatgcgctt	gcagcacatc	cccctttcgc	cagctggcga	4440
aatagcggaag	aggcccgac	cgatcgccct	tcccaacagt	tgccgagcct	gaatggcgaa	4500
tggtcgctga	tgcggtattt	tctccttacg	catctgtgctg	gtatttcaca	ccgcacgtca	4560
aagcaaccat	agtacgcgc	ctgtagcggc	gcattaagcg	cggcggtgtg	gggtggttacg	4620
cgcagcgtga	ccgctacact	tgccagcgcc	ctagcgcccg	ctcctttcgc	ttctttccct	4680
tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	4740
gggttcogag	ttagtgcctt	acggcacctc	gaccccaaaa	aacttgattt	gggtgatggt	4800
tcacgttagtg	ggccatcgcc	ctgatagacg	gtttttcgcc	ctttgacgtt	ggagtccacg	4860
ttctttaata	gtggactctt	gttccaaact	ggaacaacac	tcaaccttat	ctcgggctat	4920
ttctttgatt	tataagggat	tttgccgatt	tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	4980
taacaaaaat	ttaacgcgaa	ttttaacaaa	atattaacgt	ttacaatttt	atggtgcact	5040
ctcagtacaa	tctgctctga	tgccgcatag	ttaagccagc	cccgcacccc	gccaaccccc	5100
gctgacgcgc	cctgacgggc	ttgtctgctc	cgggcacccg	cttacagaca	agctgtgacc	5160
gtctccggga	gctgcatgtg	tcagaggttt	tcaccgctcat	caccgaaacg	cgcga	5215

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

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

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

Figura 9 (SEC N° 16): vector pYD1dXFc

acggattaga	agccgcccag	cggttgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tgggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggcccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300

ES 2 683 847 T3

taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaagtta	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctatactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	aggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcca	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgtttgcag	taattgcggt	tctcacccct	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taagggtacca	ggatccgcta	gcaccaaggg	ccccagcgtg	ttccctctgg	960
ccccagctc	caagagcacc	tccggcgcca	ccggccgccc	gggctgcctg	gtgaaggatt	1020
acttcccaga	gcccgtagcc	gtgagctgga	acagcgcgcc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	1080
cctttccggc	cgtgctgcag	tccagcgccc	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	1140
ccagcagcag	cctgggcacc	cagacctaca	tctgcaatgt	gaaccacaag	cccagcaata	1200
ccaaggtgga	taagaaggtg	gagcccaaga	gcagcgacaa	gacacacacg	tgtcccccat	1260
gtcccgcccc	tgagctgctg	ggcgccctt	ccgtgttcc	gttccctccc	aagccaaagg	1320
acacccctgat	gatctcccg	acccctgagg	tgacctgtgt	ggtggtggac	gtgagccacg	1380
aggaccacaga	ggtgaagttc	aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaaga	1440
ccaagcctag	agaggagcag	tacaacagca	cctaccgcgt	ggtgagcgtg	ctgaccgtgc	1500
tgcaccagga	ttggctgaat	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtgagcaac	aaggccctgc	1560
ctgcccccat	cgagaagacc	atctccaagg	ccaagggcca	gcctcgagaa	ccacaggtgt	1620
acacccctgcc	ccatcccg	gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	1680
tcaaaggctt	ctatcccagc	gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	1740
acaactacaa	gaccacgcct	cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	1800
agctcacccg	ggacaagagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	1860
atgaggtctc	gcacaaccac	tacacacaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaatgag	1920
cgccgctcgt	atcgagtcta	gagggccctt	cgagggttaag	cctatcccta	acctctcct	1980
cggtctcgat	tctacgcgta	ccggtcatca	tcaccatcac	cattgagttt	aaaccgcgtg	2040
atctgataac	aacagtgtag	atgtaacaaa	atcgactttg	ttcccactgt	acttttagct	2100
cgtacaaaa	acaatatact	tttctattct	ccgtaaacaa	catgttttcc	catgtaatat	2160
cctttctctat	ttttogttcc	tttaccact	ttacacatac	tttatatagc	tattcacttc	2220
tatacactaa	aaaactaaga	caattttta	tttgcctgct	gccatatttc	aatttgttat	2280
aaattcctat	aatttatcct	attagtagct	aaaaaaagat	gaatgtgaat	cgaatcctaa	2340
gagaattggg	caagtgcaca	aacaatactt	aaataaatac	tactcagtaa	taacctat	2400
ccttagcatt	ttgacgaaat	ttgctatttt	gttagagctc	tttacaccat	ttgtctccac	2460
acctccgctt	acatcaaac	caataacgcc	atttaactta	agcgcatcac	caacattttc	2520
tgccgctcag	ccaccagcta	acataaaatg	taagctctcg	gggtctctct	gccttccaac	2580
ccagtcagaa	atcgagttcc	aatccaaaag	ttcacctgtc	ccacctgctt	ctgaatcaaa	2640
caagggaata	aacgaatgag	gtttctgtga	agctgcactg	agtagtatgt	tgcagctctt	2700
tggaataacg	agctttttaa	taactggcaa	accgaggaac	tcttggattt	cttgccacga	2760
ctcatctccg	tgagttgga	cgatatcaat	gccgtaatca	ttgaccagag	ccaaaacatc	2820
ctccttaggt	tgattacgaa	acacgccaac	caagtatttc	ggagtgcctg	aactattttt	2880
atatgctttt	acaagacttg	aaattttcct	tgcaataacc	gggtcaattg	ttctctttct	2940
attgggcaca	catataatac	ccagcaagtc	agcatcgga	tctagagcac	attctgcggc	3000
ctctgtgctc	tgcaagccgc	aaactttcac	caatggacca	gaactacctg	tgaattta	3060
aacagacata	ctccaagctg	cctttgtgtg	cttaatacac	tatactcacg	tgtcgaatag	3120
tcaccaatgc	cctccctctt	ggccctctcc	ttttcttttt	tcgaccgaat	ttcttgaaga	3180
cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcattgataat	aatggtttct	3240
taggacggat	cgcttgctg	taacttacac	gcgcctcgta	tcttttaatg	atggaataat	3300
ttgggaattt	actctgtgtt	tatttatatt	tatgttttgt	atttggattt	tagaaagtaa	3360
ataaagaagg	tagaagagtt	acggaatgaa	gaaaaaaaaa	taaacaaagg	tttaaaaaat	3420
ttcaacaaaa	agcgtacttt	acatatatat	ttattagaca	agaaaagcag	attaaataga	3480
tatacatctg	attaacgata	agtaaaatgt	aaaatcacag	gattttcgtg	tgtggtcttc	3540
tacacagaca	agatgaaaca	atccggcatt	aatacctgag	agcaggaaga	gcaagataaa	3600
aggtagtatt	tgttggcgat	ccccctagag	tctttttacat	cttcggaaaa	caaaaactat	3660
tttttcttta	atttcttttt	ttactttcta	tttttaattt	atataatttat	attaaaaaat	3720
ttaaattata	attattttta	tagcacgtga	tgaaggagac	ccaggtggca	cttttcgggg	3780
aaatgtgcgc	ggaaccccta	tttgtttatt	tttctaaata	cattcaaata	tgtatccgct	3840
catgagacaa	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaagggaaga	gtatgagtat	3900
tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcggca	ttttgccttc	ctgtttttgc	3960

tcacccagaa	acgctggtga	aagtaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	cacgagtggtg	4020
ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	ccgaagaacg	4080
ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	cccgtgttga	4140
cgccggggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcat	acactattct	cagaatgact	tggttgagta	4200
ctcaccagtc	acagaaaagc	atcttacgga	tgccatgaca	gtaagagaat	tatgcagtgc	4260
tgccataacc	atgagtata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	tcggaggacc	4320
gaaggagcta	accgcttttt	tgcacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	ttgatcggtg	4380
ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	tgctgttagc	4440
aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tggcgaaacta	cttactctag	cttcccgga	4500
acaattaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	gctcgccct	4560
tcgggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tggagccggt	gagcgtgggt	ctcgcggtat	4620
cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgatc	gtagtattct	acacgacggg	4680
cagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagataggtg	cctcactgat	4740
taagcattgg	taactgtcag	accaagttaa	ctcatatata	ctttagattg	attttaaact	4800
tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	tgacaaaaat	4860
cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	tcaaaggatc	4920
ttcttgagat	cttttttttc	tgccgcta	ctgctgcttg	caaacaaaaa	aaccaccgct	4980
accagcggtg	gcttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	aggtaactgg	5040
cttcagcaga	gcgcagatac	caaatactgt	ccttctagt	tagccgtagt	tagggcacca	5100
cttcaagaac	tctgtagcac	cgccctacata	cctcgctctg	ctaactcctg	taccagtggc	5160
tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	cggtgtggac	tcaagacgat	agttaccgga	5220
taaggcgag	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	tggagcgaac	5280
gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	cgcttccga	5340
agggagaaa	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	agcgacgag	5400
ggagcttcca	ggggggaacg	cctggtatct	ttatagtctt	gtcgggtttc	gccacctctg	5460
acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	agggggggccg	agcctatgga	aaaacgccag	5520
caacgcggcc	tttttacggt	tcttgccctt	ttgctggcct	tttgctcaca	tgttctttcc	5580
tgcgttatcc	cctgattctg	tggataaccg	tattaccgcc	tttgagttag	ctgataccgc	5640
tcgcccagac	cgaacgaccg	agcgacgca	gtcagttagc	gaggaaagcg	aagagcgccc	5700
aatacgcaaa	cgccctctcc	ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	ggcagcacag	5760
gtttcccgac	tggaaagcgg	gcagttagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	acctcactca	5820
ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	tcgggtcctt	atgtgtgtg	gaattgtgag	5880
cggataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	tcggaattaa	5940
ccctcactaa	agggaaacaa	agctggctag	t			5971

Figura 10 (SEC ID N° 17): pYD1CH12

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

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

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

Figura 11 (SEC ID N° 18): _Fcab01

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

Figura 12 (SEC ID N° 19): _Fcab02

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

Figura 13 (SEC ID N° 20): Fcab03

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

Figura 14 (SEC ID N° 21) : Fcab04

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

Figura 15 (SEC ID N° 22) : Fcab05

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

Figura 16 (SEC ID N° 23) : Fcab06

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

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

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

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

aggcgagcg	gtcgggctga	acgggggggtt	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	4320
cctacaccga	actgagatac	ctacagcgctg	agcattgaga	aagcgccacg	cttcccgaag	4380
ggagaaagcg	ggacaggtat	ccggtaagcg	gcagggtcgg	aacaggagag	cgacagaggg	4440
agcttccagg	ggggaacgcc	tggatctctt	atagtcctgt	cgggtttcgc	cacctctgac	4500
ttgagcgctg	atttttgtga	tgctcgtcag	gggggcccag	cctatggaaa	aacgccagca	4560
acggcgccctt	tttacgggttc	ctggccctttt	gctggccctt	tgctcacatg	ttctttctctg	4620
cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	4680
gccgcagccg	aacgaccgag	cgacagcgag	cagtgaagca	ggaagcggaa	gagcgcccaa	4740
tacgcaaac	gcctctcccc	gcgcgttggc	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	4800
ttcccgaactg	gaaagcgggc	agtgaagcgca	acgcaattaa	tgtgagttac	ctcactcatt	4860
aggcaccacca	ggctttacac	tttatgcttc	cggctccctat	gttgtgtgga	attgtgagcg	4920
gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagctc	ggaattaacc	4980
ctcactaaaag	ggaacaaaag	ctggctagt				5009

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

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

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

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

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

tcaccaacat	tttctggcgt	cagtcaccca	gctaacataa	aatgtaagct	ctcggggctc	1200
tcttgccctc	caaccagtc	agaaatcgag	ttccaatcca	aaagttcacc	tgtcccacct	1260
gcttctgaat	caaacaagg	aataaacgaa	tgaggtttct	gtgaagctgc	actgagtagt	1320
atgttgagc	cttttgaaa	tacgagtcct	ttaataactg	gcaaaccgag	gaactcttgg	1380
tattcttgcc	acgactcatc	tccgtgcagt	tgagcgatat	caatgccgta	atcattgacc	1440
agagccaaaa	catcctcctt	aggttgatta	cgaaacacgc	caaccaagta	tttcggagtg	1500
cctgaactat	ttttatatgc	ttttacaaga	cttgaaattt	tccttgcaat	aaccgggtca	1560
attgtttctc	ttctattggg	cacacatata	ataccagca	agtcagcatc	ggaatctaga	1620
gcacattctg	cggcctctgt	gctctgcaag	cgcgaactt	tcaccaatgg	accagaacta	1680
cctgtgaaat	taataacaga	catactccaa	gctgcctttg	tgtgcttaat	cacgtatact	1740
cacgtgctca	atagtcacca	atgcccctcc	tcttgccctc	ctccttttct	tttttcgacc	1800
gaatttcttg	aagacgaaag	ggcctcgtga	tacgcctatt	tttataggtt	aatgtcatga	1860
taataatggt	ttcttaggac	ggatcgcttg	cctgtaactt	acacgcgcct	cgtatctttt	1920
aatgatggaa	taatttggga	atttactctg	tgtttattta	tttttatggt	ttgtatttgg	1980
attttagaaa	gtaataaaag	aaggtagaag	agttacgga	tgaagaaaaa	aaaaataaca	2040
aaggtttaaa	aaatttcaac	aaaaagcgta	ctttacatat	atattttatta	gacaagaaaa	2100
gcagattaaa	tagatatata	ttcgattaac	gataagtaaa	atgtaaaatc	acaggatttt	2160
cgtgtgtggt	cttctacaca	gacaagatga	aacaattcgg	cattaatacc	tgagagcagg	2220
aagagcaaga	taaaaggtag	tatttgttgg	cgatccccct	agagtccttt	acatcttcgg	2280
aaaacaaaaa	ctatttttct	tttaatttct	ttttttactt	tctattttta	atttatatat	2340
ttatatataa	aaattttaat	tataattatt	tttatagcac	gtgatgaaaa	ggaccaggtt	2400
ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	cctatttgtt	tatttttcta	aatacattca	2460
aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaccc	tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	2520
aagagtatga	gtattcaaca	tttccgtgtc	gcccttattc	ccttttttgc	ggcatttttg	2580
cttcctggtt	ttgctcacc	agaaacgctg	gtgaaagtaa	aagatgctga	agatcagttt	2640
ggtgcacgag	tgggttacat	cgaactggat	ctcaacagcg	gtaagatcct	tgagagtttt	2700
cgcccggaag	aacgttttcc	aatgatgagc	acttttaaa	ttctgctatg	tggcgcggtt	2760
ttatcccggt	ttgacgcggg	gcaagagcaa	ctcgggtcgc	gcatacacta	ttctcagaat	2820
gacttggttg	agtactcacc	agtcacagaa	aagcatctta	cggatggcat	gacagtaaga	2880
gaattatgca	gtgctgccat	aaccatgagt	gataaacactg	cggccaactt	acttctgaca	2940
acgatcggag	gaccgaagga	gctaaccgct	tttttgcaca	acatggggga	tcatgtaact	3000
cgcttgatc	gttggaac	ggagctgaat	gaagccatac	caaacgacga	gcgtgacacc	3060
acgatgcctg	tagcaatggc	aacaacgttg	cgcaaacctat	taactggcga	actacttact	3120
ctagcttccc	ggcaacaatt	aatagactgg	atggaggcgg	ataaagttgc	aggaccactt	3180
ctgcgctcgg	cccttcgggc	tggctggttt	attgctgata	aatctggagc	cggtgagcgt	3240
gggtctcggc	gtatcattgc	agcactgggg	ccagatggta	agccctcccg	tatcgtagtt	3300
atctacacga	cgggcagtc	ggcaactatg	gatgaacgaa	atagacagat	cgtcgagata	3360
ggtgcctcac	tgattaaaga	ttgtaactg	tcagaccaag	tttactcata	tatacttatg	3420
attgatttaa	ttgattttaa	tttaatttaa	aggatctagg	tgaagatcct	ttttgataat	3480
ctcatgacca	aaatccctta	acgtgagttt	tgcgttccact	gagcgtcaga	ccccgtagaa	3540
aagatcaaa	gatcttcttg	agatcctttt	tttctgcgcg	taatctgctg	cttgcaaaca	3600
aaaaaaccac	cgctaccagc	ggtggtttgt	ttgcccgatc	aagagctacc	aactcttttt	3660
ccgaaggtaa	ctggcttcag	cagagcgcag	ataccaaata	ctgtccttct	agtgtagccg	3720
tagtttaggc	accacttcaa	gaactctgta	gcaccgccta	catacctcgc	tctgctaate	3780
ctgttaccag	tggctgctgc	cagtggcgat	aagtctgtgc	ttaccgggtt	ggactcaaga	3840
cgatagttac	cggataaggc	gcagcggctg	ggctgaacgg	ggggttcgtg	cacacagccc	3900
agcttgagc	gaacgacct	caccgaactg	agatacctac	agcgtgagca	ttgagaaagc	3960
gccacgcttc	ccgaaggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	ggtcggaaca	4020
ggagagcgca	cgaggagct	tccagggggg	aacgcctggt	atctttatag	tctgtcggg	4080
tttcgccacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgatgct	cgtcaggggg	gccgagccta	4140
tggaataaac	ccagcaacgc	ggccttttta	cggttcctgg	ccttttgctg	gccttttgct	4200
cacatgttct	ttctgcgtt	atcccctgat	tctgtggata	accgtattac	cgcttttgag	4260
tgagctgata	ccgctcgcg	cagccgaacg	accgagcgca	gcgagtcagt	gagcgaggaa	4320
gcggaagagc	gccccatac	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttgcccgat	tcattaatgc	4380
agctggcacg	acaggtttcc	cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	4440
agttacctca	ctcattaggc	accccaggct	ttacacttta	tgcttccggc	tctatgttg	4500
tgtaggaattg	tgagcgata	acaatttcac	acaggaaca	gctatgacca	tgattacgcc	4560
aagctcgga	ttaaccctca	ctaaagggaa	caaaagctgg	ctagt		4605

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

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

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

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

acggattaga	agccgcgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgctg	60
cctcgtcttc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgc	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccc	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaatataca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taactcagca	agcagatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccgatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
ttactgattg	gcgcgcgga	tcgatgttaa	caaaatcgac	tttgttccca	ctgtactttt	660
agctcgtaca	aaatacaata	tacttttcat	ttctcgttaa	acaacatgtt	ttcccatgta	720
atatcctttt	ctatttttctg	ttccgttacc	aactttacac	atactttata	tagctatttca	780
cttctatata	ctaaaaaact	aagacaattt	taattttgct	gcctgccata	tttcaatttg	840
ttataaattc	ctataattta	tcctattagt	agctaaaaaa	agatgaatgt	gaatcgaatc	900
ctaagagaa	tgctgcagaa	ttcacggatt	agaagccg	gagcgggtga	cagccctccg	960
aagggaagact	ctcctccgtg	cgtcctcg	ttcacccg	gcgttctga	aacgcagatg	1020
tgctcgcgc	cgcactgctc	cgaacaataa	agattctaca	atactagctt	ttatgggttat	1080
gaagaggaaa	aattggcagt	aacctggccc	cacaaacctt	caaatgaacg	aatcaaatata	1140
acaaccatag	gatgataatg	cgattagttt	tttagcctta	tttctggggt	aattaatcag	1200
cgaagcgatg	atttttgatc	tattaacaga	tataataatg	caaaaactgc	ataaccactt	1260
taactaatat	tttcaacatt	ttcggtttgt	attacttctt	attcaaatgt	aataaaagta	1320
tcaacaaaaa	attgttaata	tacctctata	ctttaacg	aaggagaaaa	aaccccggtat	1380
cggactacta	gcagctgtaa	tacgactcac	tatagggaat	attaagctaa	ttctacttca	1440
tacattttca	attaagatgc	agttacttcg	ctgtttttca	atattttctg	ttattgtctc	1500
agtttttagca	caggaaactga	caactatatg	cgagcaaatc	ccctcaccaa	ctttagaatc	1560
gacgcgctac	ttttgttcaa	cgactactat	tttgcccaac	gggaaggcaa	tgcaaggagt	1620
ttttgaatat	tacaaatcag	taacgtttgt	cagtaattgc	ggttctcacc	cctcaacaac	1680
tagcaaaagg	agccccataa	acacacagta	tgtttttaag	cttctgcagg	ctagtgggtg	1740
tggttggttct	gggtggtggtg	gttctggtg	tggtggttct	gctagcatga	ctggtggcca	1800
gcaaggccta	attctgatgc	ggccgcacat	cattaccatc	accattgatt	aattaaagttt	1860
aaacccgctg	atctgataac	aacagtgtag	atgtaacaaa	atcgactttg	ttcccactgt	1920
acttttagct	cgtacaaaaat	acaatatact	tttcattttct	ccgtaaacaa	catgttttcc	1980
catgtaatat	ccttttctat	ttttcgttcc	gttaccacac	ttacacatac	tttatatagc	2040
tattcacttc	tatacactaa	aaaactaaga	caattttaat	tttgcctgct	gccatatttc	2100
aatttggttat	aaattcctat	aatttatcct	attagtagct	aaaaaaagat	gaatgtgaat	2160
cgaatcctaa	gagaattggg	caagtgcaca	aacaatactt	aaataaatac	tactcagtaa	2220

taacctattt	cttagcattt	ttgacgaaat	ttgctatttt	gtagaggtct	tttacaccat	2280
ttgtctccac	acctccgctt	acatcaaac	caataacgcc	atttaattct	agcgcatcac	2340
caacattttc	tggcgctcagt	ccaccagcta	acataaaaatg	taagctctcg	gggctctctt	2400
gccttccaac	ccagtcagaa	atcgagttcc	aatccaaaag	ttcacctgtc	ccacctgctt	2460
ctgaatcaaa	caagggaata	aacgaatgag	gtttctgtga	agctgcactg	agtagtatgt	2520
tgcagtcctt	tggaaatacg	agtcttttaa	taactggcaa	accgaggaac	tcttggtatt	2580
cttgccacga	ctcatctccg	tgcagttgga	cgatatcaat	gccgtaatca	ttgaccagag	2640
ccaaaacatc	ctccttaggt	tgattacgaa	acacgccaac	caagtatttc	ggagtgcctg	2700
aactattttt	atatgctttt	acaagacttg	aaattttcct	tgcaataacc	gggtcaattg	2760
ttctctttct	attgggcaca	catataatac	ccagcaagtc	agcatcggaa	tctagagcac	2820
attctgcggc	ctctgtgctc	tgcaagccgc	aaactttcac	caatggacca	gaactacctg	2880
tgaatttaac	aacagacata	ctccaagctg	cctttgtgtg	cttaatcacg	tactactacg	2940
tgctcaatag	tcaccaatgc	cctccctctt	ggccctctcc	ttttcttttt	tcgaccgaat	3000
ttcttgaaga	cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcatgataat	3060
aatgggtttc	taggacggat	cgcttgccgt	taacttacac	gcgcctcgta	tcttttaatg	3120
atggaataat	ttgggaattt	actctgtgtt	tattttattt	tatgttttgt	atttggtatt	3180
tagaaagtaa	ataaagaagg	tagaagagtt	acggaatgaa	gaaaaaaaaa	taaacaagg	3240
tttaaaaaat	ttcaacaaaa	agcgtacttt	acatatatat	ttattagaca	agaaaagcag	3300
attaaataga	tatacatctg	attaacgata	agtaaaatgt	aaaatcacag	gattttctgt	3360
tgtggtcttc	tacacagaca	agatgaaaca	attcggcatt	aatacctgag	agcaggaaga	3420
gcaagataaa	aggtagtatt	tggtggcgat	ccccctagag	tctttttacat	cttcggaaaa	3480
caaaaactat	tttttcttta	atttcttttt	ttactttcta	tttttaattt	atataattat	3540
attaaaaaat	ttaaattata	attattttta	tagcacgtga	tgaaaaggac	ccaggtggca	3600
cttttcgggg	aaatgtgcgc	ggaaccctta	tttgtttatt	tttctaata	cattcaata	3660
tgatccgct	catgagaca	taaccctgat	aaatgcttca	ataatattga	aaaaggaaga	3720
gtatgagtat	tcaacatttc	cgtgtcgccc	ttattccctt	ttttgcgcca	ttttgccttc	3780
ctgtttttgc	tcacccagaa	acgctggtga	aagtaaaaaga	tgctgaagat	cagttgggtg	3840
cacgagtggg	ttacatcgaa	ctggatctca	acagcggtaa	gatccttgag	agttttcgcc	3900
ccgaagaacg	ttttccaatg	atgagcactt	ttaaagttct	gctatgtggc	gcggtattat	3960
cccggtgtga	cgccgggcaa	gagcaactcg	gtcgccgcgt	acactattct	cagaatgact	4020
tggttgagta	ctcaccagtc	acagaaaagc	atccttacgga	tgcatgaca	gtaagagaat	4080
tatgcagtc	tgccataacc	atgagtata	acactgcggc	caacttactt	ctgacaacga	4140
tcggaggacc	gaaggagcta	accgcttttt	tgcaacaacat	gggggatcat	gtaactcgcc	4200
ttgatcggtg	ggaaccggag	ctgaatgaag	ccataccaaa	cgacgagcgt	gacaccacga	4260
tgccctgtagc	aatggcaaca	acgttgcgca	aactattaac	tgccgaacta	cttactctag	4320
cttcccgcca	acaatttaata	gactggatgg	aggcggataa	agttgcagga	ccacttctgc	4380
gctcgccct	tccggctggc	tggtttattg	ctgataaatc	tgagccgggt	gagcgtgggt	4440
ctcgcggtat	cattgcagca	ctggggccag	atggtaagcc	ctcccgtatc	gtagttatct	4500
acacgacggg	cagtcaggca	actatggatg	aacgaaatag	acagatcgct	gagatagggt	4560
ctcactgat	taagcattgg	taactgtcag	accaagttta	ctcatatata	ctttagattg	4620
atttaaaact	tcatttttaa	tttaaaagga	tctaggtgaa	gatccttttt	gataatctca	4680
tgaccaaaat	cccttaacgt	gagttttcgt	tccactgagc	gtcagacccc	gtagaaaaga	4740
tcaaaggatc	ttcttgagat	cctttttttc	tgccgctaata	ctgctgcttg	caaacaataa	4800
aaccaccgct	accagcggtg	gtttgtttgc	cggatcaaga	gctaccaact	ctttttccga	4860
aggttaactgg	cttcagcaga	gcgcagatac	caaataactgt	ccttctagtg	tagccgtagt	4920
taggccacca	cttcaagaac	tctgtagcac	cgccacata	cctcgctctg	ctaatectgt	4980
taccagtggc	tgctgccagt	ggcgataagt	cgtgtcttac	cgggttgagc	tcaagacgat	5040
agttaccgga	taaggcgag	cggtcgggct	gaacgggggg	ttcgtgcaca	cagcccagct	5100
tgagcgaac	gacctacacc	gaactgagat	acctacagcg	tgagcattga	gaaagcgcca	5160
cgcttcccga	agggagaaaag	gcggacaggt	atccggtaag	cggcagggtc	ggaacaggag	5220
agcgacagag	ggagcttcca	ggggggaacg	cctggtatct	ttatagtcct	gtcgggtttc	5280
gccacctctg	acttgagcgt	cgatttttgt	gatgctcgtc	agggggggccg	agcctatgga	5340
aaaaacgccag	caacgcggcc	tttttacggt	tcttgccctt	ttgctggcct	tttgctcaca	5400
tggtctttcc	tgcgttatcc	cctgattctg	tggaataaccg	tattaccgac	tttgagtgag	5460
ctgataccgc	tcgccgcagc	cgaacgacgc	agcgacgca	gtcagtgagc	gaggaagcgg	5520
aagagcgccc	aatacgcaaa	ccgcctctcc	ccgcgcgttg	gccgattcat	taatgcagct	5580
ggcacgacag	gtttcccagc	tggaaagcgg	gcagtgagcg	caacgcaatt	aatgtgagtt	5640
acctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	tccggtcct	atgttgtgtg	5700
gaattgtgag	cggataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	tgaccatgat	tacgccaagc	5760
tcggaattaa	ccctcactaa	agggaaacaaa	agctggctag	t		5801

Figura 22 (SEC ID N° 77) : 4D5H

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

Figura 23 (SEC ID N° 78) : 4D5L

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

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

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

ES 2 683 847 T3

tagcaaaggc	agccccataa	acacacagta	tgtttttaag	cttctgcagg	ctagtgggtg	1740
tggtgggtct	ggtgggtggt	gttctggtgg	tggtgggtct	gctagcatga	ctggtggcca	1800
gcaaggccaa	ggttctgagg	ttcaactagt	ggagtctggc	ggtggccctg	tgagccagg	1860
gggtcactc	cgtttgcct	gtgcagcttc	tggttcaac	attaaagaca	cctatataca	1920
ctgggtgct	caggccccgg	gtaaggccct	ggaatgggtt	gcaaggattt	atcctacgaa	1980
tggttatact	agatatgccg	atagcgtcaa	gggcccgttc	actataagcg	cagacacatc	2040
caaaaaacaca	gcctacctgc	agatgaacag	cctgcgtgct	gaggacactg	ccgtctatta	2100
ttgttctaga	tggtggagg	acggcttcta	tgctatggac	tactggggtc	aaggaaccct	2160
ggtcacctgc	tcctcggcta	gcaccaagg	ccccagcgtg	ttccctctgg	ccccagctc	2220
caagagcacc	tcggcgccga	ccgcccgcct	gggtgcctg	gtgaaggatt	acttcccaga	2280
gcccgtgacc	gtgagctgga	acagcggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	cctttcccgc	2340
cgtgctgcag	tcagcggcc	tgtactccct	gagcagcgtg	gtgaccgtgc	ccagcagcag	2400
cctgggcacc	cagacctaca	tctgcaatgt	gaaccacaag	cccagcaata	ccaaggtgga	2460
taagaagggtg	gagcccaaga	gctgcgcggc	cgacatcat	caccatcacc	attgattaat	2520
taagtttaaa	cccgtgctgc	tgataacaac	agtgtagatg	taacaaaatc	gactttgttc	2580
ccactgtact	tttagctcgt	acaaaatata	atatactttt	catttctccg	taaaacaacat	2640
gttttcccat	gtaatatcct	tttctatttt	tcgttccgtt	accaaacttta	cacatacttt	2700
atatagctat	tcacttctat	acactaaaaa	actaaagaca	ttttaatttt	gctgcctgcc	2760
atatttcaat	ttgttataaa	ttcctataat	ttatcctatt	agtagctaaa	aaaagatgaa	2820
tgtgaatcga	atcctaagag	aattgggcaa	gtgcacaaac	aatacttaaa	taataactac	2880
tcagtaataa	cctatttctt	agcatttttg	acgaattttg	ctattttgtt	agagtctttt	2940
acaccatttg	tctccacacc	tcgccttaca	tcaacaccaa	taacgccatt	taatctaagc	3000
gcatacccaa	cattttcttg	cgtcagtcca	ccagctaaca	taaaatgtaa	gctctcgggg	3060
ctctcttgcc	ttccaaccca	gtcagaaatc	gagttccaat	ccaaaagttc	acctgtccca	3120
cctgcttctg	aatacaacaa	gggaataaac	gaatgaggtt	tctgtgaagc	tgactgagt	3180
agtatgttgc	agtccttttg	aaatacagag	cttttaataa	ctggcaaac	gaggaactct	3240
tggtattctt	gccacgactc	atctccgtgc	agttggacga	tatcaatgcc	gtaatcattg	3300
accagagcca	aaacatcttc	cttaggttga	ttacgaaaca	cgccaacca	gtatttcgga	3360
gtgcctgaac	tatttttata	tgcttttaca	agacttgaaa	ttttccttgc	aataaccggg	3420
tcaattgttc	tccttctatt	gggcacacat	ataataccca	gcaagtgcag	atcggaatct	3480
agagcacatt	ctgcggcctc	gtgtctctgc	aagccgcaaa	ctttcaccaa	tggaaccagaa	3540
ctacctgtga	aattaataac	agacatactc	caagctgcct	ttgtgtgctt	aatcacgtat	3600
actcacgtgc	tcaatagtca	ccaatgcctt	ccctcttggc	cctctccttt	tcctttttcg	3660
accgaatttc	ttgaagacga	aagggcctcg	tgatacgcct	atttttatag	gttaatgtca	3720
tgataataat	ggtttcttag	gacggatcgc	ttgcctgtaa	cttacacgcg	cctcgtatct	3780
tttaattgatg	gaataatttg	ggaatttact	ctgtgtttat	ttatttttat	gttttgtatt	3840
tggtttttag	aaagtaataa	aagaaggtag	aagagttacg	gaatgaagaa	aaaaaaataa	3900
acaaagggtt	aaaaaatttc	aacaaaaagc	gtactttaca	tatatattta	ttagacaaga	3960
aaagcagatt	aaatagatat	acattcgtat	aacgataagt	aaaatgtaaa	atcacaggat	4020
tttcgtgtgt	ggtcttctac	acagacaaga	tgaacaat	cggcattaat	acctgagagc	4080
aggaagagca	agataaaaag	tagtatttgt	tggcgatccc	cctagagtct	tttacactct	4140
cggaaaaacaa	aaactatttt	ttcttttaatt	ttctttttta	ctttctattt	tttaatttata	4200
tatttatatt	aaaaaattta	aattataatt	atttttatag	cacgtgatga	aaaggaccca	4260
ggtggcactt	ttcggggaaa	tggtgcgcgga	accctatatt	gtttattttt	ctaaatacat	4320
tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	4380
aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	gtcgccttta	ttcccttttt	tgcggcattt	4440
tgcttctctg	tttttgcctc	cccagaaacg	ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	4500
ttgggtgcac	gagtggttta	catcgaactg	gatctcaaca	gcggtgaagat	ccttgagagt	4560
tttcgccccg	agaacggtt	tccaatgatg	agcactttta	aagttctgct	atgtggcgcg	4620
gtattatccc	gtgttgacgc	cgggcaagag	caactcggtc	gcgcataca	ctattctcag	4680
aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	gaaaagcctc	ttacggatgg	catgacagta	4740
agagaattat	gcagtgtctc	cataaccatg	agtataaca	ctgcggccaa	cttacttctg	4800
acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	4860
actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	4920
accagatgc	ctgtagcaat	ttgcgcaaac	tttgcgcaac	tattaaactg	cgaactactt	4980
actctagctt	cccggaacaa	attaatagac	tggtatggag	cggataaagt	tgacaggacca	5040
cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	tttattgctg	ataaatctgg	agccggtgag	5100
cgtgggtctc	gcgttatcat	tgagcactg	ggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	5160
gttatctaca	cgacgggcag	tcaggcaact	atggatgaac	gaaatagaca	gatcgtgag	5220
ataggctgct	cactgattaa	gcatttgtaa	ctgtcagacc	aagtttactc	atatataact	5280
tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	5340

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

Figura 25 (SEC ID N° 80): 4D5hp

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFNIK	DTYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	IYPTNGYTRY	60
ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCSRWG	GDGFYAMDYW	GQGTLLTVSS	120
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	180
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKVEP	KSC		223

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

acggattaga	agcgcgcgag	cgggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtcgcg	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tggcagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtttttt	agccttattt	ctggggtaat	taatcagcga	agcgtgattt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accactttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggtttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatat	420
ctctataact	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggatcgg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	atcttcaatt	aagatgcagt	540
tacttcgctg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	gctagccgct	ggggccatgg	600
cggatatcca	gatgaccacg	tccccgagct	ccctgtccgc	ctctgtgggc	gatagggtca	660
ccatcacctg	ccgtgccagt	caggatgtga	atactgctgt	agcctgggat	caacagaaac	720
caggaaaagc	tccgaaacta	ctgatttact	cggcatcctt	cctctactct	ggagtccttt	780
ctcgtctctc	tggtatccaga	tctgggacgg	atttcaactc	gaccatcagc	agtctgcagc	840
cgaagacttt	cgcaacttat	tactgtcagc	aacattatac	tactcctccc	acgttcggac	900
agggtaccac	ggtagagatc	aaacgtacgg	tggcggcgcc	atctgtcttc	atcttcccg	960
catctagtag	gcagcttaag	tctgggaactg	cctctgttgt	gtgcctgctg	aataacttct	1020
atcccagaga	ggccaaagta	cagtgggaag	tggtatacgc	cctccaatcg	ggtaactccc	1080
aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	agcaccctga	1140
cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	acccatcagg	1200
gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagcttca	acaggggaga	gtgttgaggc	gcgccggatc	1260
cgatgtatac	aaatcgactt	tggtccactt	gtacttttag	ctcgtacaaa	atacaatata	1320
cttttctatt	ctccgttaaac	aacatgtttt	cccatgtaat	atccttttct	atttttctgt	1380
ccgttaccaa	ctttacacat	actttatata	gctattcact	tctatacact	aaaaaactaa	1440
gacaatttta	attttgctgc	ctgccaatatt	tcaatttggt	ataaattcct	ataatttatc	1500
ctattagtag	ctaaaaaaag	atgaatgtga	atcgaaatcct	aagagaattg	ctgcagaatt	1560
cacggattag	aagccgcccga	gcgggtgaca	gccctccgaa	ggaagactct	cctccgtgcg	1620
tctcgtctct	caccggtcgc	gttccctgaa	cgcagatgtg	cctcgcgcgc	cactgctccg	1680
aacaataaag	attctacaat	actagctttt	atggttatga	agaggaaaaa	ttggcagtaa	1740
cctggcccca	caaacccttca	aatgaacgaa	tcaaattaac	aaccatagga	tgataatgcg	1800
attagttttt	tagccttatt	tctggggtaa	ttaatcagcg	aagcgtatgt	ttttgatcta	1860

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

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

Figura 27 (SEC ID N° 82) : 4D5lp

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

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

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

accattgagt	ttaaaccgcg	tgatctgata	acaacagtgt	agcgcccgct	cgatcgagtc	1440
tagaggggccc	ttcgaaggta	agcctatccc	taaccctctc	ctcggtctcg	attctacgcg	1500
taccgggtcat	catcaccatc	accattgagt	ttaaaccgcg	tgatctgata	acaacagtgt	1560
agatgtaaca	aaatcgactt	tggtccact	gtacttttag	ctcgtaaaaa	atacaatata	1620
cttttcatttt	ctccgtaaac	aacatgtttt	cccatgtaat	atoccttttct	atttttcggt	1680
ccgttaccaa	ctttacacat	actttatata	gctatttact	tctatacact	aaaaaactaa	1740
gacaatttta	attttgcctg	ctgccatatt	tcaatttggt	ataaattcct	ataattttatc	1800
ctattagtag	ctaaaaaaag	atgaatgtga	atcgaaatcct	aagagaattg	ggcaagtgcga	1860
caacaataac	ttaaataaat	actactcagt	aataacctat	ttcttagcat	ttttgacgaa	1920
atttgctatt	ttgttagagt	cttttacacc	atttgtctcc	acacctccgc	ttacatcaac	1980
accaataacg	ccatttaatc	taagcgcatc	accaacattt	tctggcgta	gtccaccagc	2040
taacataaaa	tgtaagctct	cggggctctc	ttgccttcca	accagtcag	aaatcgagtt	2100
ccaatccaaa	agttcacctg	tcccacctgc	ttctgaatca	aacaaggga	taaacgaatt	2160
aggttttctgt	gaagctgcac	tgagtagtat	gttgcaattc	tttggaata	cgagttctttt	2220
aataactggc	aaaccgagga	actcttggtg	ttcttgccac	gactcatctc	cgtgcagttg	2280
gacgatatac	atgccgtaat	cattgaccag	agccaaaaca	tctccttag	gttgattacg	2340
aaacacgcca	accaagtatt	tcggagtgc	tgaactattt	ttatatgctt	ttacaagact	2400
tgaaattttt	cttgcaataa	cgggtcaat	tgttctcttt	ctattgggca	cacatataat	2460
accagcaag	tcagcatcgg	aatctagagc	acattctcgg	gcctctgtgc	tctgcaagcc	2520
gcaaactttc	accaatggac	cagaactacc	tgtgaaatta	ataacagaca	tactccaagc	2580
tgcttttggt	tgcttaatac	cgtataactc	cgtgctcaat	agtcaccaat	gccctccctc	2640
ttggccctct	ccttttcttt	tttcgaccga	atctcttgaa	gacgaaagg	cctcgtgata	2700
cgctattttt	tataggttaa	tgctatgata	ataatgggtt	cttaggacgg	atcgcttgcc	2760
tgtaacttac	acgcgcctcg	tatcttttaa	tgatggaata	atttgggaat	ttactctgtg	2820
tttattttatt	tttatgtttt	gtatttggtg	tttagaaagt	aaataaagaa	ggtagaagag	2880
ttacggaatg	aagaaaaaaa	aataaacaac	ggtttaaaaa	atttcaacaa	aaagcgtact	2940
ttacatatat	atttattaga	caagaaaagc	agattaaata	gatatacatt	cgattaacga	3000
taagtaaaat	gtaaaatcac	aggattttcg	tgtgtggtct	tctacacaga	caagatgaaa	3060
caattcggca	ttaatacctg	agagcaggaa	gagcaagata	aaaggtagta	tttgttgccg	3120
atccccctag	agtcctttac	atcttcggaa	aacaaaaact	attttttctt	taatttcttt	3180
ttttactttt	ttttttta	ttatatattt	atattaaaaa	attttaaata	taattatttt	3240
tatagcacgt	gatgaaaagg	accaggtggg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	3300
tatttggtta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	3360
ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	3420
ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	3480
gaaagtaaaa	gtatgctgaag	atcagttggg	tgacagagtg	ggttacatcg	aactggatct	3540
caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	3600
ttttaaagtt	ctgctatgtg	gcgcgggtatt	atcccggtgt	gacgcggggc	aagagcaact	3660
cggtcgcccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	3720
gcattctaac	gatgcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	3780
taacactgcg	gccaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	3840
tttgcaaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tggaaccggg	agctgaatga	3900
agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	3960
caaactatta	actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	4020
ggaggcggtg	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttcgggctg	gctggtttat	4080
tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	atcattgcag	cactggggcc	4140
agatggtaag	ccctcccgta	tcgtagtatt	ctacacgacg	ggcagtcagg	caactatgga	4200
tgaaacgaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctactg	attaagcatt	ggtaactgtc	4260
agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aattttaaag	4320
gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgaccaa	atcccttaac	gtgagttttc	4380
gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaaagg	tcttcttgag	atcctttttt	4440
tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	4500
gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggttaac	ggcttcagca	gagcgcagat	4560
accaaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	4620
accgcctaca	tacctcgctc	tgctaactct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	4680
gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcgtcggg	4740
ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgaggagc	acgacctaca	ccgaactgag	4800
atacctacag	cgtgagcatt	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaga	aggcgagacg	4860
gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggga	4920
cgctcgggat	ctttatagtc	ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	4980
gtgatgctcg	tcaggggggc	cgagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	5040

gttcctggcc	ttttgtggc	cttttgcctc	catgtttctt	cctgcgttat	ccccgtatc	5100
tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctgcgcgca	gccgaacgac	5160
cgagcgcagc	gagtcagtg	gcgaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	aaccgcctct	5220
ccccgcgcgt	tgcccgatc	attaatgcag	ctggcacgac	agggtttccc	actggaaagc	5280
gggcagtgag	cgcaacgcaa	ttaatgtgag	ttacctcact	cattaggcac	cccaggtctt	5340
acactttatg	cttcgcgctc	ctatgtttgt	tggaattgtg	agcggataac	aatttcacac	5400
aggaaacagc	tatgaccatg	attacgcctc	gctcggaatt	aaccctcact	aaagggaaca	5460
aaagctggct	agt					5473

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

acggattaga	agccgcgcag	cggtgacag	ccctccgaag	gaagactctc	ctccgtgcgt	60
cctcgtcttc	accggtgcgc	ttcctgaaac	gcagatgtgc	ctcgcgcgcg	actgctccga	120
acaataaaga	ttctacaata	ctagctttta	tggttatgaa	gaggaaaaat	tgccagtaac	180
ctggccccac	aaaccttcaa	atgaacgaat	caaattaaca	accataggat	gataatgcga	240
ttagtTTTTT	agccttattt	ctgggtgaat	taatcagcga	agcgatgatt	tttgatctat	300
taacagatat	ataaatgcaa	aaactgcata	accacttta	ctaatacttt	caacattttc	360
ggttttgtatt	acttcttatt	caaatgtaat	aaaagtatca	acaaaaaatt	gttaatatatac	420
ctctataactt	taacgtcaag	gagaaaaaac	cccggtatcg	actactagca	gctgtaatac	480
gactcactat	agggaatatt	aagctaattc	tacttcatac	attttcaatt	aagatgcagt	540
tacttgcgtg	tttttcaata	ttttctgtta	ttgcttcagt	tttagcacag	gaactgacaa	600
ctatatgcga	gcaaatcccc	tcaccaactt	tagaatcgac	gccgtactct	ttgtcaacga	660
ctactatttt	ggccaacggg	aaggcaatgc	aaggagtttt	tgaatattac	aaatcagtaa	720
cgttttgtcag	taattgcggt	tctcacccct	caacaactag	caaaggcagc	cccataaaca	780
cacagtatgt	ttttaagctt	ctgcaggcta	gtggtggtgg	tggttctggt	ggtggtggtt	840
ctggtggtgg	tggttctgct	agcatgactg	gtggacagca	aatgggtcgg	gatctgtacg	900
acgatgacga	taaggtacca	ggatccgagc	ccaagagcag	cgacaagaca	cacacgtgtc	960
ccccatgtcc	cgccccgtag	ctgctggggc	gcccttccgt	gttccctgtt	cctcccaagc	1020
caaaggacac	cctgatgac	tcccggaacc	ctgaggtgac	ctgtgtggtg	gtggacgtga	1080
gccacgagga	ccagaggtg	aagtccaact	gttagctgga	cggcgtggag	gtgcacaacg	1140
ccaagaccaa	gcctagagag	gagcagtaac	acagcaccta	ccgcgtggtg	agcgtgctga	1200
ccgtgctgca	ccaggattgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggt	agcaacaagg	1260
ccctgcctgc	ccccatcgag	aagaccatct	ccaaggccaa	gggccagcct	cgagaaccac	1320
aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	agcctgacct	1380
gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgcccgtga	gtgggagagc	aatgggcagc	1440
cgagagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgtgtgactc	cgacggctcc	ttcttctctt	1500
acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcatgtctcc	1560
tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cacagaagag	cctctccctg	tctccgggta	1620
aatgagcggc	cgctcgatcg	agtctagagg	gcccttcgaa	ggtaagccta	tccctaacc	1680
tctcctcggt	ctcgattcta	cgctgaccgg	tcatcatcac	catcaccatt	gagtttaaac	1740
ccgtgatct	gataacaaca	gtgtagatgt	aacaaaatcg	actttgttcc	cactgtactt	1800
ttagctcgta	caaaaataca	tatacttttc	atttctcgt	aaacaacatg	ttttcccatg	1860
taatatccct	ttctattttt	cgttccgtta	ccaactttac	acatacttta	tatagctatt	1920
cacttctata	cactaaaaaa	ctaagacaat	tttaattttg	ctgcctgcc	tatttcaatt	1980
tggtataaat	tcctataaatt	tatcttatta	gtagctaaaa	aaagatgaat	gtgaatcgaa	2040
tcctaagaga	attgggcaag	tgcaaaaaca	atacttaaat	aaatactact	cagtaataac	2100
ctattttctta	gcatttttga	cgaaatttgc	tattttgtta	gagtctttta	caccatttgt	2160
ctccacacct	ccgcttacat	caacaccaat	aacgcctttt	aatctaagcg	catcaccaac	2220
atttttctggc	gtcagtcac	cagctaacat	aaaactgtaag	ctctcggggc	tctcttgctt	2280
tccaacccag	tcagaaatcg	agttccaatc	caaaagttca	cctgtccccc	ctgcttctga	2340
atcaaaacag	ggaataaacg	aatgaggttt	ctgtgaagct	gcaactgagta	gtatgttgca	2400
gtcttttgg	aatacagagtc	ttttaataac	tggaacacgc	aggaactctt	ggtattcttg	2460
ccacgactca	tctccgtgca	gttggaagat	atcaatgccc	taatacttga	ccagagccaa	2520
aacatccctc	ttaggttgat	tacgaaacac	gccaaaccaag	tatttcggag	tgccctgaact	2580
attttttatat	gctttttaca	gacttgaaat	tttcttgca	ataaccgggt	caattgttct	2640
ctttctattg	ggcacacata	taatacccag	caagtcagca	tcggaatcta	gagcacattc	2700
tgccgcctct	gtgctctgca	agccgcaaac	tttccaccaat	ggaccagaac	tacctgtgaa	2760
attaataaca	gacatactcc	aagctgcctt	tgtgtgctta	atcacgtata	ctcacgtgct	2820
caatagtcac	caatgcccctc	cctcttgccc	ctctcctttt	cttttttctga	ccgaatttct	2880
tgaagacgaa	aggccctcgt	gatacgccta	tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	2940
gtttcttagg	acggatcgct	tgccgtgaac	ttacacgcgc	ctcgtatctt	ttaatgatgg	3000

aataatttgg	gaatttactc	tgtgtttatt	tattttttatg	ttttgtattt	ggatttttaga	3060
aagtaaataa	agaaggtaga	agagttacgg	aatgaagaaa	aaaaaataaa	caaaggttta	3120
aaaaatttca	acaaaaagcg	tactttacat	atatatttat	tagacaagaa	aagcagatta	3180
aatagatata	cattcgatta	acgataagta	aaatgtaaaa	tcacaggatt	ttcgtgtgtg	3240
gtctttctaca	cagacaagat	gaaacaattc	ggcattaata	cctgagagca	ggaagagcaa	3300
gataaaaagg	agtatttgtt	ggcgatcccc	ctagagtctt	ttacatcttc	ggaaaacaaa	3360
aactattttt	tctttaattt	ctttttttac	tttctatttt	taattttatat	atttatatta	3420
aaaaatttaa	attataatta	tttttatagc	acgtgatgaa	aaggacccag	gtggcacttt	3480
tcggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	3540
tcgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	3600
gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccttttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	3660
ttttgctcac	ccagaaaacgc	tgggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	3720
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtgaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	3780
agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	3840
tgttgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	3900
tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	3960
cagtgcctgc	ataacctga	gtgataaac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	4020
aggaccgaag	gcgtaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccctga	4080
tcgttgggaa	cgggagctga	atgaagccat	accaaagcac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	4140
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaac	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	4200
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	4260
ggcccttcctg	gctggctggt	ttattgctga	taaactctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	4320
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	4380
gacggggcagt	gagcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	4440
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	4500
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	4560
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	4620
aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaactctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	4680
accgctacca	gcggtggttt	gtttgcggga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	4740
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	4800
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacataacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	4860
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttacccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	4920
accggataag	gcgcagcgg	cgggtggaac	gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttgga	4980
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagataacct	acagcgtgag	cattgagaaa	gcgccacgct	5040
tcccgaagg	agaaaggcgg	acaggatatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	5100
cacgaggag	cttcaggagg	ggaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	5160
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgctcagg	gggccgagcc	tatggaaaaa	5220
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	5280
ctttctgctg	ttatcccttg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgaagctga	5340
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	gtgagcgagg	aagcggaaga	5400
gcgccccata	cgcaaacgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	5460
cgacagggtt	cccactgga	aagcggcgag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttacct	5520
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcctatgt	tgtgtggaat	5580
tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagctcgg	5640
aattaacct	cactaaagg	aacaaaagct	ggctagt			5677