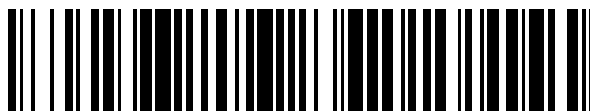


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 619**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013 PCT/EP2013/057201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150138**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013 E 13714305 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2833903**

54 Título: **Complejo de inmunoglobulina secretora**

30 Prioridad:

05.04.2012 EP 12163439

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**HIMMLER, GOTTFRIED (100.0%)
Donau-Oder-Kanal IV SW80
2301 Groß-Enzersdorf, AT**

72 Inventor/es:

HIMMLER, GOTTFRIED

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 691 619 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

Complejo de inmunoglobulina secretora

Campo de la invención

La invención se refiere a un método de producción de un componente secretor humano recombinante aislado.

5 Antecedentes

El componente secretor (SC) es un componente de la inmunoglobulina secretora (SIgA y SIgM), que comprende la parte extracelular del receptor de inmunoglobulina polimérica (plgR). Las IgA e IgM poliméricas se unen, mediado por la cadena J, al receptor de inmunoglobulina polimérica en la superficie basolateral de las células epiteliales y se absorben en la célula por transcitosis. El complejo receptor-inmunoglobulina pasa a través de los compartimentos celulares antes de ser secretado en la superficie luminal de las células epiteliales, todavía unidas al receptor. Se produce la proteólisis del receptor y la molécula de IgA dimérica o la IgM, junto con el componente secretor, están libres para difundirse a través de la luz.

Se ha descrito que el componente secretor se produce en diversas secreciones corporales tales como la saliva, lágrimas, moco y leche. Se puede encontrar como parte de inmunoglobulinas secretoras (SIg, es decir, SIgA y SIgM) y también como componente secretor libre (fSC).

El componente secretor humano (hSC) deriva del receptor de inmunoglobulina polimérica por escisión de la parte extracelular de la molécula receptora en el proceso de transcitosis. Tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 80 kDa y consiste en los primeros aproximadamente 585 aminoácidos del plgR (Receptor de Ig polimérica) dispuestos en cinco dominios de inmunoglobulina de tipo V. Tiene 7 sitios potenciales de N-glicosilación. Esta fuerte glicosilación contribuye al gran peso molecular aparente. La composición de estos glicanos incluye estructuras bi y triantennarias, estructuras tipo Lewis, así como galactosa y ácidos siálicos. Estos glicanos constituyen epítomos de unión para estructuras bacterianas, víricas, fúngicas y protozoarias tales como adhesinas y toxinas, así como mucinas y receptores en tejidos del hospedante.

Una función propuesta del componente secretor es la protección de la inmunoglobulina polimérica de la degradación proteolítica y la unión a estructuras relacionadas con patógenos y toxinas tales como *Helicobacter pylori*, *E.coli* enteropatógena, toxina A de *Clostridium difficile* y proteína A de unión a colina de *Streptococcus pneumoniae*. Los glicanos en el SC han demostrado participar en la protección innata contra los patógenos de la mucosa (Perrier et al. *The Journal Of Biological Chemistry* vol. 281 (20), pág. 14280-14287, 2006). Los autores describieron que el SC humano recombinante producido a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas se comportaba de forma idéntica al SC purificado de la leche humana. La interacción con antígenos patógenos era mediada por glicanos presentes en hSC e implicaban restos de galactosa y ácido siálico. hSC se identificó como un depurador microbiano que contribuye al arsenal antipatógeno que protege la superficie epitelial del cuerpo.

Se encontró que el SC purificado de la leche humana inhibe competitivamente la unión de la toxina A de *Clostridium difficile* a receptores (Dallas et al. *J. Med. Microbiol.* 47: 879-888 (1998)). La eliminación de hidratos de carbono de SIgA y SC por digestión enzimática mostró que la toxina A de *Clostridium difficile* se une mucho menos al SC desglucosilado que al SC glucosilado.

El SC humano presenta una amplia variedad de estructuras de glicanos, que incluyen todos los diferentes epítomos de Lewis y sialil-Lewis que potencialmente pueden unirse a lectinas y adhesinas bacterianas. Se puede encontrar galactosa unida tanto beta1-4 como beta1-3 a GlcNAc; fucosa unida alfa1-3 y alfa1-4 a GlcNAc y alfa1-2 a galactosa, así como tanto alfa2-3 como alfa2-6 a ácidos siálicos. Más de 50% de los glicanos del SC de la leche humana muestran diferentes tipos de fucosilación no nuclear, el antígeno más abundante que contiene fucosa es Lewis x. Aproximadamente 30% de los antígenos fucosilados de tipo Lewis en el SC humano están sialilados. En total, el SC de la leche humana muestra más de 50 glicofomas diferentes.

Las funciones propuestas de glicanos en SC son, p.ej.

- 45 - mediación del anclaje de la inmunoglobulina secretora en el moco,
- mediación de la unión de complejos de antígeno/inmunoglobulina secretora a ciertos receptores (p. ej., DC-SIGN),
- la acción como inhibidor competitivo ("señuelo") de la estructura del patógeno que se une a las células hospedantes, p. ej. actuando como señuelo para receptores tipo lectina expresados por toxinas patógenas, virus y bacterias.
- 50 - la protección de la inmunoglobulina secretora y del SC contra proteasas

La multitud de estructuras de glicanos encontradas en el SC natural puede reflejar la multitud de funciones. Sin embargo, para ciertos usos terapéuticos y profilácticos de inmunoglobulinas secretoras, puede ser ventajoso reducir la complejidad de la población de glicanos en una preparación de inmunoglobulina secretora. Un sesgo hacia ciertas

estructuras y modificaciones de glicanos puede aumentar la eficacia y/o reducir los posibles efectos secundarios de dicha preparación de inmunoglobulina secretora.

5 El componente secretor humano se ha expresado de forma recombinante en una variedad de organismos y células genéticamente modificados tales como bacterias (*E. coli*), células de insecto (células Sf9), células de mamífero (células de ovario de hámster chino, células de riñón de mono verde africano CV-1, células de osteosarcoma humano TK-143B, células HeLa humanas, células de riñón de hámster bebé, células de adenocarcinoma humano HT29, fibroblastos de ratón, células de riñón canino Madin-Darby) y plantas (p. ej., documentos US20080260822, EP799310, Michetti y col. 1991 *Adv Exp Med Biol*, vol 310, pág. 183-5; Suguro et al. 2011, *Protein Expr Purif*. Vol. 78, pág.143-8; Prinsloo et al. 2006 *Protein Expr Purif*. vol 47, pág.179-85; Ogura, 2005, *J Oral Sci*. vol 47, pág.15-20; 10 Matsumoto et al. 2003 *Scand J Immunol*. Vol 58, pág.471-6; Johansen et al. 1999 *Eur J Immunol*., Vol 29, pág.1701-8; Chintalacharuvu y Morrison 1999, *Immunotechnology*. Vol 4, pág.165-74; de Hoop et al. 1995. *J Cell Biol*. Vol 130, pág.1447-59; Larrick et al. 2001 *Biomol Eng*. Vol 18, pp 87-94; Berdoz et al. 1999, *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol 96, pág.3029-34; Rindisbacher et al. 1995, *J Biol Chem* vol. 270, pág. 14220-8).

15 El documento WO96/18734A1 describe la producción de SC recombinante en una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Nieuwenhof et al. (*European Journal of Biochemistry* 2000, 267 (15): 4753-4762) describen la producción de glicodelina recombinante humana en células 293 de riñón humano y en células CHO y proporcionan información para seleccionar el sistema de expresión adecuado y las condiciones de cultivo celular para la producción de una forma recombinante correctamente glicosilada.

20 Xun Xu y col. (*Nature Biotechnology* 2011, 29 (8): 735-741) describen la secuencia genómica de la línea celular CHO-K1.

Crottet et al. (*Biochemical Journal* 1999, 341 (2): 299-306) describen la producción de SC murino recombinante en células HeLa y en un clon de célula transfectada que presenta glicosilación murina.

25 El patrón de glicanos encontrado en el SC recombinante depende de la especie hospedante, el organismo hospedante, el tejido de origen y el estado fisiológico de la célula genéticamente modificada.

30 Mientras *E. coli* no puede de producir proteínas N-glicosiladas en absoluto, la mayoría de los otros hospedantes usados hasta ahora para expresar el SC recombinante no pueden producir la fucosilación de Lewis x (células Sf9, células vegetales, HeLa, células CHO, células CV-1, células 143B, células BHK, fibroblastos de ratón, células MDCK). En las condiciones descritas, HT-29 no produce eficientemente antígenos de Lewis en N-Glicanos. Las células HT-29 cultivadas en glucosa tienen propiedades de células de tránsito multipotentes indiferenciadas, son muy inestables, sin embargo, la conversión de alto contenido en manosa en complejos de glicoproteínas está muy reducida en células HT-29 en condiciones no permisivas de diferenciación (HT-29 Glc+) cualquiera que sea la fase de crecimiento estudiada.

35 Se sabe que los epítomos de hidratos de carbono en la leche materna difieren entre especies, expresando la leche humana los más complejos. Gustafsson et al. (*Glycoconjugate* 22: 109-118 (2005)) investigaron la expresión de epítomos de hidratos de carbono unidos a proteínas en muestras de leche individuales de hombres, vacas, cabras, ovejas, cerdos, caballos, dromedarios y conejos.

El patrón de glicanos encontrado en el SC depende de la especie hospedante, el organismo hospedante, el tejido de origen y el estado fisiológico del organismo (p. ej., estado de salud, fase de lactancia).

40 Royle et al. (*The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278 (22): 20140-20153) describen epítomos de glicanos en IgA secretora (SIgA) con sitios de unión a bacterias.

El documento US2008/0145420A1 describe SIgA humana para el tratamiento de enfermedades asociadas a *Clostridium difficile*.

45 Xu et al. (*World J. Gastroenterol*. 10 (14) 2063-2066 (2004)) analizaron los efectos de la leche fucosilada obtenida de una cabra transgénica. El gen de la alfa1-2/4 fucosiltransferasa humana se expresó transitoriamente en la glándula mamaria de cabra para producir leche de cabra "humanizada". Se encontró que las muestras de leche de cabra inhiben la unión bacteriana al antígeno b de Lewis.

El documento WO95/24495A1 describe la producción transgénica de oligosacáridos y glicoconjugados en leche de mamíferos transgénicos que expresan glicosiltransferasa humana.

50 Grabenhorst et al. (*Glycoconjugate Journal* 1999, 16 (2): 81-97) describen la modificación genética de glicoproteínas recombinantes en células hospedantes usadas con frecuencia, p. ej. transfección de células CHO con glicosiltransferasas.

Porter P (*Immunology* 1973, 24 (1) 163-176) describe la purificación del componente secretor porcino y la IgA secretora de la leche de cerda.

Gustafsson et al. (*Glycoconjugate Journal* 2005, 22 (3) 109-118) describen la N-glicosilación de tipo Lewis de las proteínas de la leche humana y animal.

5 El complejo plgR-plg es transportado a través de la célula, y en la superficie luminal el plgR es escindido por proteasa dentro de una región de 42 aminoácidos adyacente a la membrana celular, liberando así la Slg en el lumen.

La porción extracelular escindida del plgR permanece unida a la plg y se denomina en la presente memoria Componente Secretor (SC). El plgR también puede ser transportado a la mucosa incluso si la plg no está unida a ella, por lo tanto, la mayoría de los fluidos exocrinos contienen SC, tanto unidos dentro de Slg como también SC libre.

10 El sitio de escisión exacto todavía es ambiguo, ya que se encontró que el SC humano tiene un extremo C irregular, que varía de Ala-550 a Lys-559, con Ser-552 como el residuo C-terminal dominante.

Es posible que pueda ocurrir una proteólisis adicional después de la escisión del plgR. El hecho de que el SC libre de diferentes fluidos de la mucosa parezca tener pesos moleculares ligeramente diferentes podría sugerir que la proteólisis ocurre in vivo después de la liberación del SC libre de plgR.

15 El SC libre del calostro tiene una masa molecular de aproximadamente 76,5 kDa en comparación con aproximadamente 80 kDa para el SC unido a dIgA. Se ha mostrado que la diferencia proviene de una diferencia en la longitud de la cadena polipeptídica. Sin embargo, no existe un consenso claro sobre el extremo C-terminal del SC derivado de la leche unido a la inmunoglobulina polimérica.

20 El mayor tamaño en general del SC en SlgA1 y SlgA2 en comparación con SC libre puede ser resultado de la presencia de IgA dimérica en el primero, que puede proteger al conector C-terminal del SC cuando el plgR es escindido después de transcitosis. Esta protección por IgA dimérica estaría ausente cuando el SC libre se escinde en circunstancias similares.

25 El calostro humano y la leche son ricos tanto en proteasas como en inhibidores de proteasas. La relación de inhibidor a proteasa define si está presente la proteasa activa. La proporción cambia notablemente con el tiempo después del nacimiento y parece diferir en diferentes individuos. Dado que el péptido conector C-terminal del SC libre es muy susceptible a proteasas, podría darse el caso de que no exista un extremo C "correcto" para el SC libre del calostro y de la leche. Además, el extremo C para el SC de otros tejidos además de la glándula mamaria (como intestino, bronquios, tejidos nasales) puede mostrar diferentes extremos C, ya sea debido a diferente escisión enzimática de plgR o debido a la presencia de diferentes proteasas que cortan el SC libre o SC unido a plg.

30 Una de las moléculas más importantes para la protección contra la infección de seres humanos en sitios de mucosas (ojos, nariz, boca, pulmón, oídos, tráquea, esófago, tracto gástrico, intestino, tracto urogenital y colon) es la IgA secretora que puede actuar tanto a través de sus cuatro sitios de unión a antígeno así como a través de la unión mediada por glicano del componente secretor.

35 Muchos estudios demuestran fuertes correlaciones entre los títulos de anticuerpos SlgA específicos en las secreciones y la resistencia a la infección. Algunos estudios demuestran protección frente a la exposición sistémica con patógenos bacterianos que forman cápsulas.

40 La saliva y el calostro de sujetos normales contienen anticuerpos SlgA polirreactivos que reconocen una variedad de autoantígenos y varios antígenos bacterianos. Se ha sugerido que estos son productos de células B-1, que constituyen parte del repertorio de "anticuerpos naturales" codificados en la línea germinal, y que carecen de capacidad de memoria y maduración de afinidad. Estos anticuerpos pueden proporcionar protección de las superficies mucosas antes de la generación de anticuerpos específicos a partir de células B-2 convencionales después de la exposición a antígenos nominales. Aunque tienen baja afinidad intrínseca por los antígenos, la presencia de cuatro sitios de unión a antígenos en la SlgA aumenta su actividad funcional. De hecho, hay pruebas que sugieren que las adhesinas bacterianas han evolucionado porque son capaces de evitar el reconocimiento por estos anticuerpos polirreactivos de origen natural.

45 En seres humanos, hay dos subclases de IgA únicas (IgA1 e IgA2). Se han descrito dos o tres alotipos de IgA2 humana (diferentes combinaciones de dominios de región constante de las cadenas alfa pesadas). La forma molecular predominante de la IgA circulante (plasma) es monomérica, en contraste con la plgA dimérica (polimérica) producida en el epitelio y transportada a las secreciones como SlgA.

50 Las IgA1 e IgA2 humanas (incluidos los alotipos) parece que tienen, si las tienen, propiedades biológicas distintas, pero se observa una notable excepción en las diferencias entre las subclases de IgA en cuanto a su susceptibilidad a las proteasas bacterianas. La IgA1 e IgA2 también difieren en la distribución de las especificidades de anticuerpos.

La inmunización de adultos con antígenos proteicos provoca principalmente IgA1 y la inmunización con polisacáridos provoca principalmente una respuesta de anticuerpos IgA2. De los isotipos de inmunoglobulinas que alcanzan las

superficies mucosas, la SIgA es una de los más estables y esta estabilidad se ha atribuido en gran parte al SC que enmascara potenciales sitios de escisión dentro de la porción Fc.

5 Se demostró la especificidad de los anticuerpos SIgA por estructuras superficiales de las superficies microbianas para inhibir la adherencia a la faringe, tracto intestinal, genitourinario y epitelio gingival. Además de una inhibición específica de la adherencia, mediada por anticuerpos, la IgA y SIgA humana en particular, se unen a muchas especies bacterianas y antígenos por sus cadenas de hidratos de carbono. Un ejemplo notable de esto se ve en el caso de la IgA2, que puede aglutinar *E. coli* por un mecanismo que implica los pili de tipo I (dependiente de manosa) y la adherencia dependiente de pilus tipo I de *E. coli* a las células epiteliales.

10 La IgM en secreciones externas está asociada con un componente secretor (IgM secretora, SIgM) que resulta de su transporte a secreciones por el plgR. La concentración de SIgM es menor que la de SIgA debido a la menor proporción de células productoras de IgM en los tejidos mucosos o porque la IgM puede ser transportada peor que la plgA debido a una restricción de peso molecular en el transporte dependiente de plgR.

15 Los anticuerpos naturales, por definición, se producen en ausencia aparente de estimulación antigénica. Son producidos por un subconjunto específico de células B y no maduran en afinidad de forma extensa. Se han descrito anticuerpos naturales de las clases IgA, IgM e IgG. Estos anticuerpos son codificados habitualmente por genes de la línea germinal con pocas mutaciones, si las hay, y en muchos casos tienen una amplia reactividad contra los PAMP (patrón molecular asociado a patógenos), antígenos tumorales y una serie de autoantígenos. Debido a su baja afinidad y a su configuración de línea germinal, dichos anticuerpos polirreactivos no parecen ser verdaderos autoanticuerpos y ciertamente no encajan en la misma categoría que los autoanticuerpos patológicos de alta afinidad, específicos de antígeno, mutados somáticamente.

20 Los anticuerpos naturales se consideran parte del sistema inmunitario innato. Se han propuesto para ciertos usos terapéuticos, p. ej. terapia para el cáncer o en enfermedades infecciosas.

Muchos de los anticuerpos polirreactivos tienen una secuencia de línea germinal o cercana a línea germinal y son principalmente IgM, pero algunos también son IgG e IgA.

25 Contrariamente a la clásica hipótesis de la estructura rígida de "cerradura y llave" de la interacción antígeno-anticuerpo, se cree que el bolsillo de unión al antígeno de anticuerpos polirreactivos, quizás debido a su configuración de línea germinal, es más flexible y por lo tanto puede acomodar diferentes configuraciones antigénicas.

30 Aunque algunos informes han sugerido que la SIgA es de naturaleza polirreactiva, otros hallazgos apuntan a una especificidad restringida que puede ser de reacción cruzada.

35 El documento WO2009139624A1 describe un procedimiento para producir composiciones que son ricas en IgA secretora por fraccionamiento de leche no humana. Dichas composiciones se pueden usar en particular para tratar y/o prevenir infecciones y/o inflamación de las superficies mucosas, p. ej., el tracto gastrointestinal, tracto urogenital, tracto respiratorio, cavidad nasal o cavidad oral, tratar y/o prevenir la obesidad y enfermedades relacionadas, o tratar y/o prevenir alergias alimentarias en sujetos que necesitan dicho tratamiento.

40 Es bien sabido que la leche humana contiene altas cantidades de glicoconjugados glicosilados de Lewis, tales como glicoproteínas (tales como SIgA y SC) y es bien aceptado que uno de los valores de la leche humana es su alta potencia protectora contra la infección por anticuerpos, glicanos, oligosacáridos y otras sustancias activas tales como lisozima y lactoferrina. Mientras que el análisis de la leche humana ponía de manifiesto una distribución de fucosilación de 75%, solo se observó una distribución de fucosilación de 31% en el análisis de leche bovina. Solo se detectó fucosilación central en el análisis de leche bovina.

45 Aunque las inmunoglobulinas secretoras humanas con cierta glicosilación han demostrado un efecto ventajoso con respecto a la unión a estructuras patógenas, mucinas y receptores, todavía no se habrían podido producir a gran escala en una calidad deseable. Por razones éticas, la leche humana típicamente no se considera como un material de origen adecuado.

Resumen de la invención

50 El objetivo de la presente invención es proporcionar un método mejorado para producir una preparación de inmunoglobulina secretora de alta calidad a escala industrial. Además, el objetivo es proporcionar un método de producción para la producción mejorada de SC recombinante, para usar en la producción de preparaciones de inmunocomplejos, en particular adecuado para aplicaciones en mucosas.

El objetivo se ha resuelto mediante la materia objeto de las reivindicaciones.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para producir un componente secretor (SC) humano recombinante aislado caracterizado por al menos 2 moles de fucosa no centrales por mol de SC, expresando el SC

de una línea celular hospedante de producción recombinante que expresa una alfa-1,x-fucosiltransferasa heteróloga funcional, en donde x es 2, 3 o 4.

Específicamente, la línea celular del hospedante de producción es una línea celular CHO.

5 Específicamente, se obtiene una preparación de SC en donde al menos 90% de las moléculas de SC tienen el mismo extremo C.

Específicamente, el SC comprende la secuencia de aminoácidos de SC humano como se proporciona en la SEQ ID 1, o uno de sus fragmentos, con un extremo C después del aminoácido G545 de la SEQ ID 1, o una variante funcionalmente activa de la misma que es capaz de unirse a dímeros de IgA para formar un inmunocomplejo secretor.

10 Específicamente, el SC es expresado a partir de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SC humano como se proporciona en la SEQ ID 1, o uno de sus fragmentos, con un codón de terminación respectivo para obtener un extremo C después del aminoácido G545 de la SEQ ID 1.

15 De acuerdo con la invención, se proporciona además un método para preparar una preparación de inmunocomplejo que comprende producir el SC como se describe en la presente memoria, y combinar dicho SC con una inmunoglobulina polimérica.

Específicamente, dicha inmunoglobulina polimérica es la IgA dimérica.

Específicamente, la IgA es IgA humana.

Específicamente, el método comprende además producir una formulación en forma de un líquido, emulsión o suspensión o en forma seca.

20 De acuerdo con un aspecto específico, la preparación del inmunocomplejo se basa en una inmunoglobulina secretora, que deriva de una secreción no humana, y el método descrito en la presente memoria comprende

- proporcionar un sistema de producción a escala industrial, capaz de producir un componente secretor N-glicosilado,

25 - producir mediante dicho sistema un componente secretor que comprende al menos 2 mol de fucosa no centrales por mol del componente secretor, y

- combinar dicho componente secretor con al menos una de inmunoglobulinas IgA o IgM que tienen un patrón de glicosilación natural para obtener un inmunocomplejo, en particular un patrón de N-glicosilación natural. Dicha preparación de inmunocomplejo se entiende específicamente en la presente como una preparación de inmunocomplejo innato, que apoyaría específicamente el sistema inmunitario innato de un mamífero.

30 La fucosa no central proporciona específicamente los epítomos de Lewis. Por lo tanto, el inmunocomplejo descrito en la presente memoria también se dice en la presente memoria que comprende al menos 0,01 moles de epítomos de Lewis por mol del componente secretor. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la fucosilación no central del SC se determina en un ensayo adecuado.

35 Se prefiere que el sistema de producción sea capaz de producir proteínas N-glicosiladas de tipo Lewis, específicamente un componente secretor con fucosilación periférica o antenaria, tal como brazo externo, como se determina por medios analíticos adecuados, tales como técnicas electroforéticas, cromatográficas, de espectroscopía de masas, químicas y enzimáticas o combinaciones de las mismas.

Específicamente, la invención proporciona un componente secretor que deriva de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de origen humano.

40 Específicamente, el método de acuerdo con la invención emplea un sistema de producción que se selecciona de cultivos de células recombinantes.

En una realización específica, dicho componente secretor deriva de una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de la especie humana.

45 En un método preferido, el componente secretor se enriquece en una fracción del sistema de producción y se aísla de dicha fracción. Específicamente, la preparación del componente secretor descrito en la presente memoria se obtiene de dicha fracción enriquecida. Específicamente dicho componente secretor está enriquecido en la fracción como inmunocomplejo.

50 Preferiblemente, el contenido relativo de fucosa no central es al menos 2 mol/mol de SC, al menos 3 mol/mol de SC, al menos 4 mol/mol de SC, al menos 5 mol/mol de SC, al menos 6 mol/mol de SC al menos 7 mol/mol de SC, al menos 8 mol/mol de SC, al menos 9 mol/mol de SC, o al menos 10 mol/mol de SC.

En casos específicos, el número teórico de sitios de N-glicosilación asciende a 7 (humano) mol/mol de SC. De acuerdo con la invención, se prefiere específicamente que la cantidad de fucosas no centrales o epítopos de Lewis sea de al menos 1%, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% del valor teórico de los sitios de N-glicosilación, más preferido al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% hasta el valor teórico. La cantidad de fucosa no central puede superar la cantidad teórica de sitios de N-glicosilación, p. ej., mediante fucosilación múltiple por sitio de N-glicosilación, obteniendo así más epítopos de Lewis que el número de sitios de N-glicosilación en una base molar. En casos específicamente preferidos, la cantidad de fucosas no centrales o epítopos de Lewis es al menos 1,1 veces, preferiblemente al menos 1,2 veces, o al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, a al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, o al menos 2 veces, en casos específicos, la cantidad es incluso mayor, p. ej. al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces, o al menos 6 veces, o al menos 7 veces, o al menos 8 veces, o al menos 9 veces, p. ej. hasta 10 veces la cantidad teórica de sitios de N-glicosilación.

El umbral, de al menos 2 moles de fucosa no central por mol de SC, refleja la alta calidad de una preparación de SC.

El grado de fucosilación no central en una preparación se puede aumentar mediante selección de SC con una fucosilación no central alta (por mol de SC). Esto se puede hacer a nivel de selección de un hospedante de producción (tal como selección de una línea celular, un clon microbiano o un organismo. La fucosilación se puede aumentar mediante fucosilación enzimática o química de una preparación de SC o un inmunocomplejo descrito en la presente memoria.

De acuerdo con una realización específica, la inmunoglobulina se obtiene de fuentes agrupadas que comprenden la inmunoglobulina de la calidad deseada, que se proporcionan como productos intermedios. Dichos productos intermedios se pueden seleccionar de leche en polvo o suero en polvo, p. ej. liofilizados o secados por atomización, o mezclas de plasma o fracciones de plasma agrupadas que contienen inmunoglobulina plasmática. Los productos intermedios después se pueden procesar más para enriquecer la fracción de inmunoglobulina, p. ej., al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces o incluso más.

Una preparación específica producida como se describe en la presente memoria que está enriquecida en SC y/o SIgA comprende específicamente al menos un 20% de SC y/o SIgA, o al menos un 30%, o al menos un 40%, o al menos un 50% (en p/p de proteína total).

Aunque el inmunocomplejo de SIgA o SIgM preferiblemente no se obtiene completamente de fuentes recombinantes tales como células genéticamente modificadas, en particular con respecto al componente de IgA o IgM del inmunocomplejo, que preferiblemente no es recombinante, de acuerdo con una realización específica, el componente secretor se obtiene de una célula hospedante recombinante, p. ej., se obtiene de una célula hospedante que expresa N-glucosiltransferasas heterólogas y especialmente fucosiltransferasas, preferiblemente una línea de células hospedantes de producción recombinante que expresa alfa-1,x-fucosiltransferasa funcional heteróloga, en donde x es 2, 3 o 4, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en línea celular humana, línea celular de mamíferos, línea celular aviar, bacterias, planta, levadura, insecto, hongos, musgo y arqueas.

De acuerdo con un aspecto específico, la invención proporciona un componente secretor recombinante aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID 1, o una variante funcionalmente activa de la misma, que tiene un patrón de N-glicosilación de tipo Lewis y al menos 2 moles de fucosa no central por mol de componente secretor. Específicamente, el SC recombinante comprende una secuencia de SC humana, o una secuencia de origen de SC humana. De acuerdo con una realización preferida, el SC recombinante es un SC humano o una variante funcionalmente activa del mismo.

Específicamente, el componente secretor recombinante descrito en la presente memoria comprende ácido siálico, preferiblemente al menos 2 moles de ácido siálico por mol de componente secreto. Más específicamente, el SC recombinante comprende al menos 2 moles de sialilo de Lewis x por mol de SC.

Alternativamente, el componente secretor recombinante descrito en la presente memoria no está sialilado, comprendiendo preferiblemente menos de 0,1 moles de ácido siálico por mol de componente secretor.

El SC recombinante se puede producir por introducción del gen completo de plgR, p. ej. el plgR humano, en una célula hospedante, posterior expresión de la proteína de transmembrana plgR seguida de una escisión y liberación de la parte extracelular, el SC, en el líquido sobrenadante del cultivo. Una expresión alternativa es la transcripción de la secuencia de nucleótidos del SC, es decir, solo los dominios extracelulares, como los que codifican la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1. En todos los casos, la expresión del SC recombinante permite la selección exacta de las condiciones de producción que garantizan un extremo C homogéneo del producto final.

También permite elegir el sitio de finalización de la traducción de acuerdo con las necesidades. Preferiblemente, el codón de terminación en el gen del SC que se va a expresar está situado entre la codificación del último dominio similar a la inmunoglobulina extracelular (dominio 5) y la región transmembrana. Sin embargo, el SC recombinante descrito en la presente memoria puede ser incluso más corto siempre que sea capaz de unirse a inmunoglobulina polimérica y contenga el nivel requerido de fucosa no central.

- 5 Los primeros 18 aminoácidos en la SEQ ID 1 comprenden el péptido señal que puede sustituirse por un péptido señal diferente dependiendo de las células u organismos hospedantes usados y la eficacia de la secreción requerida. Para la producción por síntesis química o producción intracelular de SC, no se requiere el péptido señal (p. ej., para la producción de la forma no glicosilada en cuerpos de inclusión de *E. coli*). La proteína también puede modificarse para contener aminoácidos adicionales en el extremo C de la SEQ ID 1.
- La proteína se puede terminar mediante un codón de terminación en la posición requerida en el ácido nucleico, respectivamente, después del codón para el aminoácido G545, preferiblemente en cualquier sitio de aminoácido entre K566 y E607 (incluyendo estos sitios), más preferido entre R603 y E607 (incluyendo estos sitios), o después de E607. Más preferiblemente, el SC termina después de R603. La numeración se refiere a la SEQ ID 1.
- 10 Preferiblemente, la preparación de SC descrita en la presente memoria es homogénea, en donde al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, hasta el 100% de las moléculas de SC tienen el mismo extremo C.
- El patrón de glicanos del SC recombinante depende de la especie hospedante, el organismo hospedante, el tejido de origen y el estado fisiológico de la célula genéticamente modificada.
- 15 Preferiblemente, la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en células humanas tales como PerC.6, células de ovario de hámster chino, células de riñón de hámster bebé, células murinas, líneas celulares aviares, células bacterianas, de levadura fúngicas, plantas e insectos. Se puede obtener un SC recombinante con la fucosilación no central deseada o la N-glicosilación de tipo Lewis. Preferiblemente, las células hospedantes se seleccionan o modifican para expresar las glicosiltransferasas requeridas para producir fucosilación de N-glicosilación no central. La fucosilación no central se puede introducir o aumentar después de expresar el SC recombinante, p. ej. mediante técnicas enzimáticas o químicas o quimioenzimáticas.
- 20 El grado de fucosilación no central en una preparación descrita en la presente memoria se puede aumentar mediante la selección de SC con una fucosilación no central alta (por mol de SC). Esto se puede hacer a nivel de selección de un hospedante de producción (tal como cribado para una línea celular, un clon microbiano o un organismo transgénico), también se puede hacer a nivel de donantes individuales que se seleccionan para proporcionar secreciones que contienen SC con una alta fucosilación no central molar, para la mezcla posterior de estas muestras. La fucosilación se puede introducir o aumentar mediante fucosilación enzimática o química de una preparación de SC o un inmunocomplejo innato descrito en la presente memoria.
- 25 Preferiblemente, el contenido relativo de x epítopos de Lewis en SC como se usa como se describe en la presente memoria es de al menos 0,01 mol/mol de SC, preferiblemente de menos 0,02 mol/mol de SC, más preferido al menos 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 o 0,1 mol/mol de SC, más preferido al menos 0,2, 0,3, 0,4, o 0,5 mol/mol de SC, incluso más preferido al menos 1 mol/mol de SC o incluso mayor, p. ej., al menos 2 mol/mol de SC, 3 mol/mol de SC, 4 mol/mol de SC, 5 mol/mol de SC, 6 mol/mol de SC, 7 mol/mol de SC, 8 mol/mol de SC, 9 mol/mol de SC, o al menos 10 mol/mol de SC.
- 30 Un SC recombinante aislado específicamente preferido, p. ej. en una preparación de SC recombinante, tiene un patrón de N-glicosilación de tipo Lewis y al menos 2 moles de fucosa por mol de componente de secretor.
- 35 Específicamente, comprende al menos 2 mol de x epítopos de Lewis por mol SC, en algunos casos al menos 6 mol/mol.
- Específicamente, comprende ácido siálico, preferiblemente al menos 2 moles de ácido siálico por mol de componente secretor. Específicamente, comprende al menos 2 moles de sialilo de Lewis x por mol de componente secretor.
- 40 Alternativamente, el SC recombinante específicamente no está sialilado, comprendiendo preferiblemente menos de 0,1 mol de ácido siálico por mol de componente secretor.
- De acuerdo con un aspecto específico, se proporciona una preparación de inmunocomplejo que comprende un componente secretor recombinante descrito en la presente memoria, y al menos una de inmunoglobulinas IgA o IgM, preferiblemente inmunoglobulinas humanas. Específicamente, las inmunoglobulinas son inmunoglobulinas plasmáticas, p. ej. derivadas del plasma sanguíneo humano o una fracción de plasma sanguíneo.
- 45 De acuerdo con el aspecto específico de la invención, se proporciona además una preparación de inmunocomplejo basada en una inmunoglobulina secretora, derivada de fuentes distintas de las secreciones humanas, que comprende
- 50 - un componente secretor con un patrón de fucosilación no central o N-glicosilación de tipo de Lewis y al menos 2 moles de epítopos de Lewis mol por mol de componente secretor, y
- al menos una de inmunoglobulinas IgA o IgM que tiene un patrón de glicosilación natural.
- La preparación descrita en la presente memoria comprende específicamente una inmunoglobulina polimérica, tal como una inmunoglobulina dímera, pentámera u otra polimérica, p. ej. SIgA dímera o SIgM pentámera.

Preferiblemente, la inmunoglobulina se obtiene a partir de leche animal, calostro o cualquiera de las fracciones de leche o calostro o concentrados y plasma sanguíneo o fracciones de los mismos.

Específicamente, la preparación de acuerdo con la invención comprende una inmunoglobulina polirreactiva, preferiblemente una inmunoglobulina natural, que incluye anticuerpos de línea germinal.

- 5 De acuerdo con una realización específica, se proporciona además una formulación que comprende el componente secretor (recombinante) aislado o purificado descrito en la presente memoria o una preparación de inmunocomplejo descrita en la presente memoria, en forma de un líquido, emulsión o suspensión o en forma seca, preferiblemente secada por atomización o liofilizada.

- 10 La formulación descrita en la presente memoria específicamente se puede proporcionar en forma de una formulación natural como un producto lácteo, donde el inmunocomplejo se proporciona en el contexto natural, tal como leche, o productos lácteos tales como queso, yogur, suero de leche, suero concentrado o sino una formulación sintética que comprende el SC o inmunocomplejo aislado o purificado. Específicamente, la formulación descrita en la presente memoria se puede proporcionar en forma de un líquido, jarabe, pastilla, comprimido, tal como un comprimido efervescente, un pulverizador, formulación de inhalador, polvo, polvo instantáneo, gránulos, supositorio, cápsulas, crema, pasta, gel, gotas, suspensión, emulsión o producto alimenticio, incluyendo productos lácteos y goma de mascar.

Preferiblemente, la formulación es una formulación para usar en mucosa, en particular para uso oral.

- 20 Según una realización específica adicional, se proporciona el componente secretor (recombinante) aislado o purificado descrito en la presente memoria o una preparación de inmunocomplejo descrito en la presente memoria o una formulación descrita en la presente memoria, para usar en la terapia o profilaxis de la deficiencia de inmunoglobulina, p. ej. p.ej. deficiencia selectiva de IgA, deficiencia selectiva de IgM o CVID, en particular deficiencia de inmunoglobulina en la mucosa, preferiblemente en una formulación para aplicación en mucosa, preferiblemente uso oral, bronquial, nasal, vaginal, intragástrico o rectal.

- 25 Por lo tanto, se proporciona un método respectivo de tratamiento o prevención de la deficiencia de inmunoglobulina en la mucosa administrando una cantidad eficaz de los compuestos o composiciones descritos en la presente memoria a un sujeto que lo necesite.

- 30 Los sujetos, en particular sujetos humanos, pueden necesitar tratamiento de inmunodeficiencia transitoria, adquirida y crónica, p. ej. que están en riesgo padecer o padecen deficiencia de inmunoglobulina en la mucosa y, por lo tanto, ser elegible para dicho tratamiento, p. ej. para normalizar y/o elevar el nivel de SIgA y/o SIgM en la mucosa, p. ej. como se determina en muestras de mucosa, o indirectamente en sangre.

Las indicaciones terapéuticas específicas son, por ejemplo, enfermedades infecciosas, tales como del tracto nasofaríngeo, tracto urogenital, los ojos y el tracto gástrico, p. ej. sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado proximal, infecciones recurrentes del tracto urinario o infecciones broncopulmonares crónicas.

- 35 Un uso preferido es la prevención de una enfermedad o trastorno causado por un patógeno, que incluye sustancias u organismos microbianos, antígenos o agentes causantes de enfermedades, tales como toxinas.

Específicamente, se trata al sujeto que está en riesgo o que padece infecciones, alergias, p. ej. un sujeto en riesgo o que padece síntomas alérgicos y enfermedades autoinmunitarias. Específicamente, el sujeto padece deficiencia de IgA y/o IgM, que incluye deficiencia selectiva de IgA y/o IgM, deficiencia de SIgA y/o deficiencia de SIgM, y específicamente una deficiencia combinada de IgA/IgM secretoras.

- 40 De acuerdo con un aspecto específico adicional, el sujeto se trata con una preparación oral, p. ej. para proporcionar una dosis única de 10 mg a 10 g de SIgA y/o SIgM, p. ej. una preparación en donde cualquiera de las SIgA o SIgM está contenida en una cantidad de 10 mg a 10 g por unidad de administración, p. ej. como la inmunoglobulina predominante, o una combinación de SIgA y SIgM en la cantidad de 10 mg a 10 g en total.

- 45 La formulación descrita en la presente memoria se puede proporcionar en particular para usar como producto alimenticio y/o para uso terapéutico. Específicamente, la formulación se puede proporcionar como un suplemento dietético, alimento de gestión nutricional, aditivo alimentario o alimento médico.

Figuras:

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos del componente secretor humano

- 50 La figura 2 muestra la secuencia de ácido nucleico del componente secretor humano que incluye sitios de clonación en los extremos 5' y 3'.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la alfa 1,2-fucosiltransferasa (FUT2)

La figura 4 muestra el gen de la alfa 1,2-fucosiltransferasa (FUT2) con los respectivos sitios de clonación (subrayado)

La Figura 5 muestra la secuencia de proteína de la fucosiltransferasa 3

La Figura 6 muestra el gen de fucosiltransferasa 3 con los respectivos sitios de clonación (subrayado, cursiva)

5 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la beta 1,3-galactosiltransferasa I

La Figura 8 muestra el gen de la beta 1,3-galactosiltransferasa I con los respectivos sitios de clonación (subrayado, cursiva)

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la beta 1,3-galactosiltransferasa V

10 La Figura 10 muestra el gen de la beta 1,3-galactosiltransferasa V con los respectivos sitios de clonación (subrayado, cursiva)

La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la beta 1,3-galactosiltransferasa II

La Figura 12 muestra el gen de la beta 1,3-galactosiltransferasa II con los respectivos sitios de clonación (subrayado, cursiva)

15 La Figura 13 muestra la secuencia de proteína de la cadena pesada de IgA anti-nitrofenilo quimérica (letras minúsculas = péptido líder, subrayado = VH murino)

La Figura 14 muestra la secuencia de ADN de la construcción de cadena pesada de IgA anti-nitrofenilo quimérica, que incluye los sitios de restricción HindIII y XbaI (subrayados).

La Figura 15 muestra un esquema de un ensayo rápido para detectar inmunoglobulinas secretoras fucosiladas no en el centro (Lewis-glicosiladas).

20 La Figura 16 muestra la reducción de la citotoxicidad de la toxina A de *Clostridium difficile* tras la incubación con preparaciones de inmunoglobulina secretora. Se ensayan dos preparaciones SIgA de cabras individuales con diferente fucosilación no central en comparación con una muestra SIgA bovina, cada una de ellas en una cantidad equimolar a la toxina. Como control positivo, se usa SIgA humano en una cantidad equimolar y en una cantidad diez veces mayor. Como control negativo, se usa albúmina de suero bovino (BSA).

25 La Figura 17 muestra los resultados del cribado de preparaciones de SIgA obtenidas de leche de animales individuales. En el ensayo ELISA, la fucosilación no central de SIgA se determina por la unión de glicosilación específica de Lewis a la lectina DC-SIGN. Como control positivo, se usa SIgA de la leche humana. Como control negativo, se usa SIgA de leche de cabra comercial (mezclada con leche sin cribar de animales individuales).

Descripción detallada de la invención

30 La expresión "similar a humano" o "humanizado" como se usa en la presente memoria con respecto a un componente secretor (SC) o una preparación de inmunocomplejo se referirá a un SC humano, p. ej. SC recombinante humana, o derivado de otras especies, pero no derivado de secreciones humanas, tales como la leche humana. El SC humanizado se diseña o selecciona específicamente para obtener una preparación de SC con un patrón de N-glicosilación que comprende fucosas no centrales o epítomos de Lewis. Específicamente se prefiere un
 35 SC o inmunocomplejo "similar a humano" o "humanizado" que comprende un SC similar a humano o humanizado, que se obtiene de secreciones no humanas de glándula mamaria y seleccionado para un alto grado de glicosilación con epítomos de Lewis, u obtenido como un SC recombinante basado en una secuencia de origen humano o una secuencia humanizada con un patrón de fucosilación que comprende los epítomos de Lewis deseados. El SC humanizado comprende específicamente fucosilación periférica, antenaria o del brazo externo (resumido bajo la
 40 expresión "fucosilación no central"), que demostró conferir un efecto antipatógeno y propiedades específicas de unión al receptor (p. ej., unión a DC-SIGN en células dendríticas).

Un SC o inmunocomplejo "humanizado" como se describe en la presente memoria difiere de una leche "humanizada" obtenida de animales transgénicos, esencialmente porque tiene un nivel alto seleccionado de epítomos Lewis en el SC, y todavía tiene un patrón de N-glicosilación natural en otras glicoproteínas, tales como
 45 inmunoglobulinas, para evitar el exceso de fucosilación, específicamente exceso de fucosilación periférica. Por consiguiente, las inmunoglobulinas en el inmunocomplejo tienen un patrón de glucosilación natural, p. ej. un patrón de N-glicosilación natural con solo N-glicanos fucosilados centrales.

El término "natural" como se usa en la presente memoria con respecto al patrón de glicosilación de
 50 inmunoglobulinas, en particular IgA y/o IgM, significará la glicosilación producida por células B de un mamífero, que se caracteriza específicamente por la glicosilación sin fucosilación no central. y específicamente sin epítomos de Lewis. Los epítomos de Lewis típicamente no son producidos por células B naturales o no modificadas de un mamífero.

- La expresión "fucosilación no central" o "epítomos de Lewis" como se usa en la presente memoria, se referirá a antenas de glicanos con fucosilación, en particular en posiciones no centrales, que incluyen fucosilación periférica, antenaria o de brazo externo. Se refiere específicamente a epítomos de un antígeno de Lewis o antígeno de tipo H reconocible por una inmunoglobulina o anticuerpo específico. Los epítomos de Lewis se pueden presentar en antígenos del grupo sanguíneo de Lewis, que incluyen los antígenos Lewis x (LeX), Lewis y (LeY), Lewis b (LeB) y Lewis a (LeA). La expresión "epítomos de Lewis" también se referirá a antígenos de tipo H I y tipo H II así como a antígenos sanguíneos A y B. Los antígenos de Lewis se pueden modificar adicionalmente, p. ej. por ácido siálico, para formar p. ej. epítomos de Lewis sialilados. Los antígenos de Lewis pueden estar sialilados y/o sulfatados. Los epítomos Lewis preferidos provienen de antígenos LeX y LeX sialilados.
- La referencia a una "fucosilación no central" específica con respecto al SC como se hace en la presente memoria se referirá a una preparación de glicoproteínas de SC, p. ej. SC recombinante aislado o aislado de fuentes mezcladas, p. ej. leche o fracciones de leche. Por lo tanto, se aplica a una preparación que comprende moléculas de SC individuales, que tiene cada una un patrón de glicosilación específico, tal como que tiene uno o más restos de fucosa antenarios externos (o no centrales) unidos a él. Por lo tanto, la glicosilación del SC se determina en la preparación como se describe en la presente memoria.
- Para fines ilustrativos y no limitantes, un SC recombinante se puede expresar en una célula CHO genéticamente diseñada (modificada) tal como se describe en la presente memoria, y la mayoría de las moléculas SC individuales pueden tener un resto de fucosa no central en un sitio de N-glicosilación específico del SC. Dicha "fucosilación no central" se puede caracterizar de una variedad de formas. Se hace referencia en cada caso a un número relativamente alto (o mayor) de las moléculas de glicoproteína SC de la población que tiene restos de fucosa no centrales en comparación con una población de las moléculas de glicoproteína SC hechas en una línea celular que carece de una modificación de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.
- También se puede producir una fucosilación no central específica del componente secretor por adición enzimática y/o química de fucosa a un sitio que muestra poca o ninguna fucosilación antes de la adición.
- Otra forma de caracterizar una preparación de glicoproteína SC descrita en la presente memoria es mediante la relación de fucosilación no central a glicosilación global en el componente secretor aislado producido. Un componente secretor recombinante descrito en la presente memoria tiene una relación de N-glicosilación fucosilada no central:N-glicosilación total que es aproximadamente de 1:1 a 1:5, 1:5 a 1:10, 1:10 a 1:30, 1:30 a 1:100.
- Otra forma de caracterizar un componente secretor recombinante aislado es la cantidad relativa de epítomos formados por restos de fucosa no centrales (estructuras de grupos sanguíneos fucosilados) respecto al componente glicano de la glicoproteína SC.
- La expresión "patrón de glicosilación natural" como se usa en la presente memoria con respecto a la IgA e IgM, se referirá a un patrón de N-glicosilación encontrado en las cadenas pesadas de IgA o IgM, que esencialmente no contiene epítomos de Lewis, sino solo fucosilación central, si existe. Aunque el patrón de glicosilación natural de las glicoproteínas difiere de una especie a otra, hay una variedad típica de propiedades de glicosilación dentro de una población dentro de una especie, tal como el número teórico y las posiciones de sitios con hidratos de carbono. Las inmunoglobulinas secretoras de animales tales como vacas, cabras y ovejas, normalmente tienen un patrón de glicosilación similar dentro de una especie en términos de sitios de glicosilación teóricos.
- Aun así, el porcentaje de sitios realmente glicosilados dentro de un patrón de glicosilación se encontró que variaba entre 0 y 100%, dependiendo principalmente de parámetros como raza, edad, familia, alimentación, fase de lactancia, estado de salud, estado fisiológico y procesamiento de la leche.
- Las expresiones "patrón de fucosilación no central" o "patrón de N-glicosilación de tipo Lewis" como se usan en la presente memoria con respecto al SC como se usa como se describe en la presente memoria, se referirá a un patrón de glicosilación que comprende fucosa y epítomos de Lewis unidos a N en posiciones no centrales, p. ej. posiciones periféricas, antenarias o del brazo externo. Durante la glicosilación, se forman glicoproteínas N-unidas u O-unidas. Las glicoproteínas N-unidas constituyen la mayoría de las proteínas de la superficie celular y proteínas secretadas. Las estructuras del grupo sanguíneo de Lewis están formadas por determinada fucosilación de glicanos antenarios. Por ejemplo, las estructuras de Lewis x y Lewis a son (Gal-beta1-4) (Fuc-alfa1-3) GlcNAc y (Gal-beta1-3) (Fuc-alfa1-4) GlcNAc, respectivamente. Estas estructuras se pueden sialilar adicionalmente (NeuAca2,3-) para formar las correspondientes estructuras sialiladas. Otras estructuras de grupo sanguíneo de Lewis de interés son las estructuras de Lewis y y de Lewis b que son (Fuc-alfa1-2)Gal-beta1-4 (Fuc-alfa1-3) GlcNAc y (Fuc-alfa1-2)Gal-beta1-3 (Fuc-alfa1-4) GlcNAc, respectivamente. Otros epítomos de Lewis son de antígenos tipo H I y tipo H II ((Fuc-alfa1-2)Gal-beta1-3GlcNAc y (Fuc-alfa1-2)Gal-beta1-4GlcNAc respectivamente) y antígenos sanguíneos A y B ((GalNAc-alfa1-3)Fuc-alfa1-2Gal-beta1-3GlcNAc y (Gal-alfa1-3)Fuc-alfa1-2Gal-beta1-3GlcNAc, respectivamente). Para una descripción de las estructuras de las estructuras del grupo sanguíneo ABO y Lewis y las enzimas implicadas en su síntesis, véase Ma et al., 2006, *Glycobiology* vol. 16, no. 12 pág. 158R-184R.

La fucosilación no central o patrón de N-glicosilación de tipo Lewis del SC de ejemplo se describen como sigue:

- 5 Un N-glicano (oligosacárido unido a N, oligosacárido unido a N-(Asn)) es una cadena de azúcar unida covalentemente a un residuo de asparagina de una cadena polipeptídica, que implica normalmente un resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y la secuencia peptídica consenso: Asn-X-Ser/Thr. Los N-glicanos comparten una región central de pentasacáridos común y se pueden dividir en general en tres clases principales: tipo oligomanosa (o altos en manosa), tipo complejo y tipo híbrido.
- En N-glicanos de vertebrados, la modificación principal central es la adición de fucosa en un enlace alfa1-6 a la N-acetilglucosamina adyacente a la asparagina en el centro (= fucosilación central).
- 10 La mayoría de los N-glicanos complejos e híbridos tienen ramificaciones alargadas que se producen por adición de un resto de galactosa β -unida a la N-acetilglucosamina iniciadora para producir la unidad estructural ubicua Galbeta1-4GlcNAc, denominada acetil-lactosamina tipo-2N o secuencia "LacNAc". Las antenas se pueden alargar más mediante la adición secuencial de, p. ej. restos de N-acetilglucosamina y galactosa.
- Los motivos más importantes para "rematar" o "decorar" incluyen ácido siálico, fucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina y sulfato en las ramificaciones. Todos estos restos de fucosa se denominan en la presente memoria restos de fucosa no centrales:
- 15 El grupo sanguíneo de Lewis y los antígenos relacionados son un conjunto de glicanos que llevan restos de alfa1-2, alfa1-3, alfa1-4-fucosa o una combinación de los mismos. Los determinantes del grupo sanguíneo determinantes A, B y H en los antígenos del grupo sanguíneo tipo 1 y tipo 2 presentan fucosa en el enlace alfa1-2.
- 20 Las siguientes estructuras específicas se consideran como "fucosilación no central" en el SC: glicanos que llevan restos de fucosa alfa1-2, alfa1-3, alfa1-4 o una combinación de los mismos, Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, los determinantes del grupo sanguíneo determinantes A, B y H en los antígenos de grupo sanguíneo de tipo 1 y tipo 2 y sus formas sialiladas y/o sulfatadas.
- 25 El número máximo o teórico de epítomos de Lewis de una glicoproteína puede ser igual o superior a su número de sitios de glicosilación ya que puede haber múltiples epítomos de Lewis por sitio de N-glicosilación, p. ej. por ramificación, extensiones y repeticiones de estructuras. Por ejemplo, un SC humano tiene 7 sitios de glicosilación, por lo tanto, son posibles más de 7 epítomos de Lewis. Puesto que un epítomo de Lewis puede comprender una o más fucosas no centrales, el número de fucosas no centrales puede superar el número de epítomos de Lewis en una glicoproteína.
- 30 En casos específicamente preferidos, la cantidad de fucosas no centrales o epítomos de Lewis es al menos 1,1 veces, preferiblemente al menos 1,2 veces, o al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, a al menos 1.7 veces, al menos 1.8 veces, al menos 1.9 veces, o al menos 2 veces, en casos específicos, la cantidad es incluso mayor, por ejemplo al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces, o al menos 6 veces, o al menos 7 veces, o al menos 8 veces, o al menos 9 veces, p. ej. hasta 10 veces la cantidad teórica de sitios de N-glicosilación.
- 35 La N-glicosilación de tipo Lewis puede ser conferida por las respectivas fucosiltransferasas, que se han usado en rutas sintéticas para transferir una unidad de fucosa de la guanosina-5'-difosfocosa a un hidroxilo específico de un aceptor de sacárido. Las fucosiltransferasas heterólogas pueden ser expresadas por organismos recombinantes para expresar glicoproteínas fucosiladas.
- 40 El término "inmunocomplejo" como se usa en la presente memoria se referirá a un complejo de proteína que comprende al menos una molécula de inmunoglobulina unida a un componente secretor por un enlace no covalente o covalente. Las asociaciones no covalentes comprenden, por ejemplo, interacciones electrostáticas o hidrófobas. Dentro de un inmunocomplejo descrito en la presente memoria, se proporciona al menos una IgA y/o al menos una molécula de IgM, que puede estar unida covalentemente a otras inmunoglobulinas, de modo que se forman inmunoglobulinas poliméricas. En la naturaleza, dicha multimerización ocurre a través de la cadena J de anticuerpos poliméricos o por otras interacciones no covalentes.
- 45 La expresión "escala industrial" se referirá a la producción a gran escala de inmunocomplejos, a partir de fuentes naturales o sistemas de expresión recombinantes, incluyendo cultivos celulares. El sistema de expresión a escala industrial como se describe en la presente memoria preferiblemente tiene una productividad probada de al menos 10 mg de inmunocomplejo por litro, preferiblemente 100 mg por litro, y un volumen preferido de al menos 100 litros, más preferiblemente de al menos 1000 litros, p. ej. por fuentes mezcladas.
- 50 El término "innato" con respecto a un inmunocomplejo se referirá a un inmunocomplejo que gobierna o estimula la respuesta o función inmunitaria innata en animales, incluyendo mamíferos, entre ellos sujetos humanos o pacientes. Aunque un inmunocomplejo innato descrito en la presente memoria puede apoyar la defensa inmunitaria contra patógenos de una manera relativamente no específica, también puede reconocer específicamente epítomos de sustancias antigénicas en partículas o disueltas.
- 55 El término "aislado" o "purificado" con respecto a las proteínas, tales como el SC o el inmunocomplejo descritos en la presente memoria, como se usa en la presente memoria se refiere a una proteína que se obtiene de una mezcla

5 compleja de fluidos o secreciones corporales de un animal, por lo tanto, de origen natural, o de cultivos celulares, como un líquido sobrenadante de cultivo celular o un extracto de tejido o célula. Esas proteínas son típicamente al menos 50% puras, preferiblemente al menos 60% puras, más preferiblemente al menos 70% puras, incluso más preferiblemente al menos 80% puras, lo más preferiblemente al menos 90% puras e incluso más preferiblemente al menos 95% puro, determinado por SDS-PAGE.

10 La expresión "componente secretor" o "SC" como se usa en la presente memoria se referirá a un componente secretor que puede ser secretado por una glándula mamaria de un animal, incluyendo seres humanos, o variantes de los mismos, incluyendo variantes funcionales, y dicho SC es, p. ej. una glicoproteína separada de una inmunoglobulina o en complejo con una inmunoglobulina, p. ej. para formar un inmunocomplejo secretor, p. ej. mediado por la cadena J (o sus variantes) u otras estructuras de inmunoglobulinas que se unen específicamente al receptor de poli-inmunoglobulina (plgR). Un SC se puede obtener de fuentes naturales, tales como calostro o leche, o se puede producir sintéticamente o por técnicas de expresión recombinante.

El SC como se usa en la presente memoria específicamente está fucosilado no centralmente, como se describe además en la presente memoria. Además, el patrón de glicosilación puede comprender o no epítomos de sialilo.

15 Específicamente, el SC se proporciona como preparación de proteínas sialiladas o no sialiladas. Preferiblemente, la relación entre glicanos sialilados y no sialilados como se proporciona en la presente memoria es, en una preparación altamente sialilada, preferiblemente al menos 3:1, preferiblemente al menos 4:1, o al menos 5:1, o al menos 6:1, o al menos 7:1. La relación en una preparación de baja sialilación, que incluye proteínas no sialiladas (asialiladas), en la presente memoria también entendida como una preparación no sialilada, es menor que 1:3, preferiblemente menor que 1:4, o menor que 1:5, o menor que 1:6, o menos de 1:7. Preferiblemente, el SC tal como se proporciona en dicha preparación contiene o bien solo glicanos no sialilados o glicanos sialilados.

20 Preferiblemente, el contenido relativo de epítomos de x sialil-Lewis en SC recombinante es al menos 0,02 mol/mol de SC, más preferido al menos 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, o 0,1 mol/mol de SC, más preferido al menos 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 mol/mol de SC, incluso más preferido al menos 1 mol/mol de SC o incluso superior, p. ej. al menos 2 mol/mol de SC, 3 mol/mol de SC, 4 mol/mol de SC, 5 mol/mol de SC, 6 mol/mol de SC, 7 mol/mol de SC, 8 mol/mol de SC, 9 mol/mol de SC, o al menos 10 mol/mol de SC. Una preparación de SC específicamente preferida comprende al menos 2 mol de epítomos de x sialil-Lewis por mol SC, en algunos casos al menos 6 mol/mol.

30 El SC y el inmunocomplejo descritos en la presente memoria tienen la ventaja de una glicosilación más homogénea que puede mejorar los efectos de la mucosa, p. ej. la glicosilación homogénea se debe a menos glicofomas diferentes a pesar de tener un grado alto de fucosilación no central, p. ej. menos de 20 glicofomas de SC diferentes, o menos de 10 glicofomas de SC diferentes, o incluso menos de 5 glicofomas de SC diferentes.

Aunque la función primaria de la inmunoglobulina secretora parece estar promoviendo la exclusión de antígenos y patógenos, existe evidencia de que una fracción del anticuerpo secretado es realmente transportado "hacia atrás" de nuevo a la mucosa.

35 Hay evidencia de que SIgA es endocitosada después de la asociación con DC-SIGN en la superficie celular de las células dendríticas (DC). Basándose a estos resultados, se propuso que DC-SIGN puede servir como el receptor en las DC mucosales implicadas en el reconocimiento e internalización de SIgA, y posiblemente de los complejos de SIgA-antígeno.

40 Es bien sabido que la unión de inmunoglobulina secretora a DC-SIGN es mediada por los glicanos del componente secretor. DC-SIGN reconoce una variedad de ligandos oligosacáridos, que incluyen manano, glicoconjugados complejos con alto contenido en manosa y antígenos del grupo sanguíneo de Lewis no sialilados.

45 Con el fin de potenciar la unión de un inmunocomplejo a las células dendríticas a través de DC-SIGN, es ventajoso usar el SC con un grado bajo de sialilación pero con fucosilación no central alta para la preparación de inmunoglobulinas secretoras. Dicho SC mínimamente sialado o incluso no sialado se puede usar para producir preparaciones de inmunoglobulinas poliméricas monoclonales o policlonales que se unen a antígenos a los que el organismo debería ser tolerante (p. ej., antígenos dietéticos, alérgenos).

50 Por otro lado, puede ser ventajoso proporcionar una preparación de inmunoglobulina secretora que no se una a células dendríticas mediante DC-SIGN, o que tenga una eficacia menor en la unión a DC-SIGN. Esto se puede lograr usando un SC fucosilado no centralmente con alto sialilado para la preparación del inmunocomplejo innato descrito en la presente memoria. Dicha preparación se puede usar para mejorar el efecto señuelo de la inmunoglobulina secretora con respecto a ciertos virus, toxinas y otras estructuras de patógenos.

Sialil-Lewis x es un determinante constitutivamente expresado en granulocitos y monocitos y media la extravasación inflamatoria de estas células.

55 La presencia o ausencia de sialil-Lewis x en el inmunocomplejo descrito en la presente memoria puede aumentar la eficacia o disminuir los efectos secundarios de los tratamientos con un inmunocomplejo descrito en la presente memoria mediante la interferencia o evitando la interferencia con una situación inflamatoria.

- 5 El grado de sialilación en una preparación se puede aumentar o disminuir mediante la selección de SC con una sialilación molar alta o baja (por mol de SC), respectivamente. Esto se puede hacer a nivel de selección de un hospedante de producción (tal como una línea celular, un clon microbiano o un organismo), se puede hacer a nivel de donantes individuales que se seleccionan para proporcionar secreciones que contienen SC con sialilación molar alta o baja respectivamente para la posterior mezcla de estas muestras. La sialilación se puede aumentar o disminuir por sialilación enzimática o química y desialilación, respectivamente, de una preparación de SC o un inmunocomplejo innato descrito en la presente memoria.
- 10 Para la cuantificación absoluta de ácidos siálicos de una muestra de glicoproteína (moles de ácidos/moles de glicoproteína), se puede aplicar un procedimiento de glicoanálisis basado en espectroscopía de masas. Alternativamente, se puede usar un método colorimétrico como se describe en la monografía 1316 de la Farmacopea Europea para la eritropoyetina. Este método se basa en Svennerholm, 1957, *Biochim Biophys Acta*. Vol 24, pág. 604-11.
- 15 Por consiguiente, una preparación pura de una cantidad definida de SC se trata con resorcinol y ácido clorhídrico a 100°C, el complejo azul formado se separa con alcohol butílico/acetato de butilo, seguido de medición fotométrica a 580 nm. Las lecturas fotométricas se convierten en una masa mediante una curva de calibración producida con ácido siálico.
- 20 La expresión "inmunoglobulina secretora" como se usa en la presente memoria se referirá a una inmunoglobulina que puede ser secretada por una glándula mamaria de un animal incluyendo seres humanos, p. ej. mediado por el plgR o sus variantes, incluyendo variantes funcionales. Una inmunoglobulina secretora se puede obtener de fuentes naturales, tales como calostro o leche, en particular como una SIgA y/o SIgM, o producir sintéticamente o por técnicas de expresión recombinante o por una combinación de inmunoglobulina polimérica de fuentes naturales tales como plasma sanguíneo y un SC recombinante o por una combinación de inmunoglobulina polimérica producida por técnicas de expresión recombinante y un SC de fuentes naturales tales como leche u otros fluidos corporales.
- 25 El término "recombinante" como se usa en la presente memoria se refiere a proteínas (incluyendo polipéptidos) producidas por ingeniería genética o técnicas de recombinación génica que emplean un sistema de expresión recombinante, como organismos hospedantes, tales como procariotas o eucariotas, en un sistema de reactor contenido tal como fermentación microbiana o cultivo celular, p. ej. usando una línea celular o cepa hospedante productora como una levadura, hongo, bacteria o arquea, una línea celular, de células de mamífero, células de insecto, células vegetales o tejidos respectivos.
- 30 La expresión "sistema de expresión" o "sistema de producción" como se usa en la presente memoria se referirá a organismos como cultivos celulares u organismos eucarióticos superiores, como animales lactantes seleccionados, sin embargo, no se incluyen seres humanos, capaces de producir proteínas e inmunocomplejos de la calidad y cantidad deseadas. Los sistemas preferidos usan vectores de expresión para usar en un hospedante eucariota.
- 35 Los "vectores de expresión" o "vectores" como se usan en la presente memoria se definen como secuencias de ADN que se requieren para la transcripción de secuencias de nucleótidos recombinantes clonadas, es decir, de genes recombinantes y la traducción de sus ARNm en un organismo hospedante adecuado. Dichos vectores de expresión pueden comprender un origen para replicación autónoma en las células hospedantes, marcadores seleccionables (p. ej., un gen de síntesis de aminoácidos esenciales o un gen que confiere resistencia a antibióticos tales como zeocina, kanamicina, G418 o higromicina), una serie de sitios de escisión de enzimas de restricción, una secuencia promotora adecuada y un terminador de la transcripción, cuyos componentes están unidos operativamente entre sí.
- 40 La expresión "hospedante eucariota" significará cualquier célula, tejido u organismo eucariótico, que se puede cultivar para expresar una proteína. Específicamente, el hospedante eucariota es una línea celular hospedante eucariota. Se entiende bien que el término no incluye seres humanos. Los hospedantes preferidos para expresar el SC descrito en la presente memoria son hospedantes eucariotas.
- 45 La expresión "célula hospedante" o "línea de célula hospedante" se refiere a un microorganismo o una línea celular, usada para la expresión de un gen recombinante para producir las proteínas recombinantes como se describe en la presente memoria. Las células hospedantes preferidas se seleccionan del grupo que consiste en células de mamíferos, aves, insectos o plantas, levaduras, hongos filamentosos o bacterias. Para producir el componente secretor descrito en la presente memoria, se usan preferiblemente células hospedantes capaces de producir glicoproteínas con fucosilación no central o N-glicosilación de tipo Lewis. Un clon de célula hospedante de células hospedantes cultivadas que han proliferado se entiende normalmente que es una línea celular hospedante. Se entiende normalmente que una línea celular de producción es una línea celular lista para usar para el cultivo en un biorreactor para obtener el producto a escala industrial.
- 50 La expresión "inmunoglobulina polimérica" como se usa en la presente memoria se referirá a una asociación de al menos 2, 3, 4, 5 o incluso un número mayor de hasta 10 moléculas de inmunoglobulina. Por lo tanto, la inmunoglobulina polimérica se considera una inmunoglobulina al menos dímera, p. ej. IgA dímera, trímera, cuatrómera, pentámera, tal como SIgM, inmunoglobulina hexámera o incluso polímeros o agregados superiores. Las inmunoglobulinas poliméricas pueden comprender las moléculas de inmunoglobulina asociadas entre sí por enlaces
- 55

covalentes, u otras interacciones, como interacciones electrostáticas, hidrófobas, iónicas o unión por afinidad con o sin cadena J.

5 La expresión "inmunoglobulina polirreactiva" como se usa en la presente memoria se referirá a una inmunoglobulina con al menos dos especificidades, que significa que reconoce al menos dos epítomos diferentes, también conocido como reactividad cruzada. Típicamente, las inmunoglobulinas polirreactivas de un sistema inmunitario innato tendrían al menos 3, 4, 5 o más especificidades relevantes (p. ej., con respecto a fisiológicamente relevantes o farmacológicamente activas) para unir epítomos y antígenos, lo más habitualmente con afinidades bajas o medias.

10 El término "alimento" o "producto alimenticio" comprenderá cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para un animal o destinada a ser ingerida por un animal. Esto incluye cualquier compuesto que sea un complemento nutricional, nutracéutico o alimenticio, alimento dietético o complemento o alimento médico que se entiende como complemento nutricional o funcional de un producto alimenticio, posiblemente usado como una dieta. Típicamente, los productos alimenticios funcionales ayudan en la prevención o profilaxis y/o tratamiento de enfermedades asociadas con patógenos, incluyendo toxinas, o el tratamiento de desequilibrios fisiológicos del cuerpo. El término también comprenderá piensos o productos de piensos, posiblemente usados como una dieta para alimentar animales no humanos. Los alimentos pueden ser de fuentes orgánicas o sintéticas, formulados en composiciones naturales o de tipo natural que incluyen productos lácteos o composiciones sintéticas basadas en mezclas artificiales de sustancias, que se han purificado adecuadamente antes de mezclar. El producto alimenticio descrito en la presente memoria se proporciona típicamente en calidad de grado alimentario. La calidad de grado alimentario es la característica de calidad de alimentos que son aceptables para animales. Esto incluye factores externos como aspecto (tamaño, forma, color, brillo y consistencia), textura y sabor. Los estándares de calidad también proporcionan una cantidad máxima aceptable de sustancias contaminantes. Además de la calidad de los ingredientes, también existen requisitos sanitarios para inactivar o reducir patógenos. Es importante asegurarse de que el entorno de procesamiento de alimentos sea lo más limpio posible con el fin de producir el alimento más seguro posible para el consumidor.

25 El término "variante" o "variante funcionalmente activa" de una proteína como el componente secretor o una inmunoglobulina, como se usa en la presente memoria significa una secuencia que resulta de la modificación de la secuencia original por inserción, eliminación o sustitución de uno o más aminoácidos o nucleótidos dentro de la secuencia o en uno o ambos extremos distales de la secuencia, y cuya modificación no afecta (en particular deteriora) la actividad de esta secuencia. En una realización preferida, la variante es una variante funcionalmente activa, que a) es un fragmento biológicamente activo del aminoácido o la secuencia de nucleótidos, comprendiendo el fragmento funcionalmente activo al menos el 50% de la secuencia de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, preferiblemente al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, 98% o 99%; b) deriva de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos por al menos una sustitución, adición y/o eliminación de aminoácidos, en donde la variante funcionalmente activa tiene una identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o nucleótidos o con el fragmento funcionalmente activo como se ha definido en a), de al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97% , 98% o 99%; y/o c) consiste en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos y además al menos un aminoácido o nucleótido heterólogo respecto a la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, preferiblemente en donde la variante funcionalmente activa deriva de o es idéntica a cualquiera de las variantes que se encuentran de forma natural de cualquiera de las secuencias encontradas en diferentes bases de datos de genes y proteínas. Dichas variantes funcionalmente activas que son específicamente preferidas comprenden un patrón de glicosilación preferido como se describe en la presente memoria, específicamente el patrón de N-glicosilación de tipo Lewis y la fucosilación no central del SC. Otras variantes funcionalmente activas preferidas se caracterizan por su capacidad para unirse a la inmunoglobulina polimérica, p. ej. dímeros de IgA o pentámeros de IgM, para formar un inmunocomplejo secretor.

50 La mayoría de las secuencias de SC se describen como receptores de polinmunoglobulina completos (pIgR), para el propósito de la invención solo es relevante la parte extracelular de estas secuencias, p. ej.: la secuencia de SC humano como se proporciona en la SEQ ID 1, o secuencias comprendidas en o esencialmente idénticas a lo siguiente:

UniProtKB: locus PIGR_BOVIN, nº de acceso P81265 (pIgR bovino)

UniProtKB: locus PIGR_HUMAN, nº de acceso P01833 (pIgR humano)

UniProtKB: locus PIGR_RAT, nº de acceso P15083 (pIgR de rata)

UniProtKB: locus PIGR_MOUSE, nº de acceso O70570 (pIgR de ratón)

55 UniProtKB: locus PIGR_RABIT, nº de acceso P01832 (pIgR de conejo)

NCBI REFSEQ: nº de acceso NM_174143.1 (pIgR bovino)

nº de acceso de embl X81371.1 (pIgR bovino)

- GenBank GenBank: DAA21480.1 (plgR bovino)
 GenBank: AAI49033.1 (plgR bovino)
 NCBI REFSEQ: nº de acceso XM_537133.2 (plgR bovino)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_002635.2 (plgR humano)
- 5 Secuencia de referencia de NCBI: NP_035212.2 (plgR de ratón)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_036855.1 (plgR de rata)
 GenBank: AAK69593.1 (plgR de ualabí)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_001125098.1 (plgR de orangután)
 GenBank: EAW93516.1 (plgR humano)
- 10 GenBank: EAW93515.1 (plgR humano)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_999324.1 (plgR de cerdo)
 GenBank: BAJ20784.1 (plgR humano)
 Secuencia de referencia de NCBI: XP_001083307.2 (plgR de macaco)
 Secuencia de referencia de NCBI: XP_002760783.1 (plgR de Callithrix)
- 15 GenBank: AAD41688.1 (plgR de zarigüeya)
 GenBank: EDM09843.1 (plgR de rata)
 GenBank: AAI10495.1 (plgR humano)
 GenBank: AAI10496.1 (plgR humano)
 Secuencia de referencia de NCBI: XP_514153.2 (plgR de chimpancé)
- 20 GenBank: AAC53585.1 (plgR de ratón)
 GenBank: AAQ14493.1 (plgR de pollo)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_001038109.1 (plgR de pollo)
 GenBank: AAP69598.1 (plgR de pollo)
 GenBank: AAW71994.1 (plgR de pollo)
- 25 GenBank: AAH13556.1 (plgR de ratón)
 GenBank: EDL39729.1 (plgR de ratón)
 GenBank: CAA76272.1 (plgR de ratón)
 GenBank: BAA24431.1 (plgR de ratón)
 Secuencia de referencia de NCBI: NP_001164516.1 (plgR de conejo)
- 30 Secuencia de referencia de NCBI: XP_001492348.2 (plgR de caballo)
 GenBank: AAC41620.1 (plgR bovino)
 GenBank: AAB23176.1 (plgR humano)
 GenBank: AAB20203.1 (plgR humano)
 GenBank: ABK62772.1 (plgR de xenopus)
- 35 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias polipeptídicas identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica específica, después de alinear la secuencia e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de

secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo según sea necesario para lograr una alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

- 5 La variante funcionalmente activa se puede obtener por alteraciones de secuencia en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, en donde las alteraciones de secuencia retienen una función de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos inalterada, cuando se usan en combinación con la invención. Dichas alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones (conservadoras), adiciones, eliminaciones, mutaciones e inserciones.

- 10 Se puede obtener una variante SC funcionalmente activa por intercambio de dominios entre SC de diferentes especies, o por eliminación o adición de dominios. El cambio del orden natural de los dominios (p. ej., 1-2-3-4-5 para SC de mamífero) también puede dar como resultado una variante funcionalmente activa (p. ej., 1-4-3-2-5).

- 15 En una realización específica descrita en la presente memoria, el polipéptido o la secuencia de nucleótidos como se ha definido anteriormente se puede modificar por una variedad de técnicas químicas para producir derivados que tienen esencialmente la misma actividad (como se ha definido antes para fragmentos y variantes) como el polipéptido o secuencia de nucleótidos modificada, y teniendo opcionalmente otras propiedades deseables, como reactividad, sitios de N-glicosilación y estabilidad (estabilidad in vivo o in vitro). Las propiedades deseables son, por ejemplo, el aumento en la termoestabilidad y/o estabilidad gastrointestinal, como se mide por la estabilidad del pH y/o la estabilidad de la proteína frente a proteasa (por ejemplo, pancreática). El patrón de glicosilación de la inmunoglobulina puede afectar a numerosos aspectos de la eficacia terapéutica del SC tales como solubilidad, resistencia al ataque proteolítico e inactivación térmica, inmunogenicidad, semivida, bioactividad y estabilidad, o capacidad de unirse a inmunoglobulina polimérica.
- 20

- 25 Las variantes de SC descritas en la presente memoria pueden tener secuencias de aminoácidos alteradas para introducir sitios de glicosilación adicionales. Una realización preferida descrita en la presente memoria es la adición de sitios de N-glicosilación. Esto se puede lograr mediante técnicas de ingeniería genética, así como con medios químicos y enzimáticos. La introducción del motivo de secuencia Asn-Xaa-Thr-Xaa (SEQ ID NO: 15) o Asn-Xaa-Ser-Xaa (SEQ ID NO: 16) (en el que Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina) en varios sitios del SC puede permitir la selección de variantes funcionalmente activas con características mejoradas (p. ej., estabilidad, unión a estructuras de patógenos, unión a la pIg). Puede permitir que un SC derivado de humano tenga más de 7 sitios de glicosilación.

- 30 La variante del polipéptido o la secuencia de nucleótidos es funcionalmente activa en el contexto de la presente invención, si la actividad de la composición descrita en la presente memoria que incluye la variante (pero no el original) asciende a al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferido al menos 70%, todavía más preferiblemente al menos 80%, en especial al menos 90%, en particular al menos 95%, lo más preferiblemente al menos 99% de la actividad de la inmunoglobulina o SC como se describe en la presente memoria incluyendo la
- 35 secuencia de aminoácidos o nucleótidos sin alteración de secuencia (es decir, el polipéptido o la secuencia de nucleótidos original).

- 40 Las variantes funcionalmente activas se pueden obtener cambiando la secuencia como se ha definido antes y se caracterizan por tener una actividad biológica similar a la presentada por la respectiva secuencia a partir de la cual deriva la variante o similar a SC humana, incluida la capacidad de modificar la respuesta inmunitaria frente a patógenos, la unión a estructuras patógenas y otras moléculas.

Además, la expresión "variante funcionalmente activa" incluye variantes alélicas que se encuentran de forma natural, así como mutantes o cualquier otra variante que no se encuentra de forma natural. Como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más aminoácidos que no altera esencialmente la función biológica del polipéptido.

- 45 En una realización preferida, la variante funcionalmente activa derivada de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos como se ha definido antes por intercambios, eliminaciones o inserciones de aminoácidos también puede conservar, o más preferiblemente mejorar, la actividad.

- 50 Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Ejemplos de dichas familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares sin carga, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes, etc.

- 55 La expresión "deficiencia de inmunoglobulina en mucosa" significa una concentración de inmunoglobulinas presente en muestras de mucosa por debajo del intervalo normal o de referencia. Esto se refiere específicamente al contenido de SIgA o SIgM o una combinación tanto de SIgA como de SIgM.

La expresión "deficiencia de IgA secretora" o "deficiencia de SIgA" es una deficiencia en la IgA secretora. El término "deficiencia de IgM secretora" o "deficiencia de SIgM" es una deficiencia en IgM secretora.

Estas deficiencias de inmunoglobulina secretora pueden ser causadas por disposición genética, productos químicos o por la alteración local de la producción de SIg en el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), p. ej., por estrés, desnutrición, lesión o cirugía.

MALT se entiende en el hombre como, p. ej.,

- 5 - GALT (tejido linfoide asociado al intestino. Los parches de Peyer son un componente de GALT que se encuentra en el revestimiento del intestino delgado).
- BALT (tejido linfoide asociado a los bronquios)
- NALT (tejido linfoide asociado a la nariz)
- LALT (tejido linfoide asociado a la laringe)
- 10 - SAL (tejido linfoide asociado a la piel)
- VALT (tejido linfoide asociado a vascular)

EALT (tejido linfoide asociado a los ojos formado por tejidos linfoides asociados a la conjuntiva [CALT] y al lagrimal [LDALT])

La deficiencia de SIgA puede estar asociada con la deficiencia de SIgM.

- 15 La detección de deficiencia de IgA secretora y/o IgM secretora se hace por medición de SIgA y/o SIgM en secreciones tales como saliva, moco de cuello uterino, moco nasal, jugo gástrico, sudor, orina o heces, mediante técnicas de inmunoensayo convencionales o mediante técnicas de biología molecular. La detección inmunológica de SIgA y/o SIgM en secreciones se puede llevar a cabo por ELISA, RIA, por inmunoensayos basados en fluorescencia, fluorimetría resuelta en el tiempo, ensayos de precipitación, ensayos nefelométricos, ensayos basados en resonancia de plasmón superficial y configuraciones similares con y sin marcadores. Un requisito importante es la detección del componente secretor unido a las moléculas de inmunoglobulina con el fin de poder discriminar la SIgA y/o SIgM de IgA y/o IgM.
- 20

- 25 La detección por técnicas de biología molecular de la deficiencia de SIg se puede llevar a cabo mediante el ensayo de la expresión de cadena J y/o pIgR en tejidos y células respectivos, ya sea a nivel de proteína con anticuerpos, específicos para esas moléculas o en el nivel genético con sondas específicas para los genes de esas moléculas. Se pueden investigar tanto el ARN como el ADN. Los métodos para la detección pueden ser ensayos basados en la hibridación con o sin amplificación de molde (tal como PCR) o amplificación de señal.

- 30 Una deficiencia de SIgA en la mucosa puede ser un indicador fuerte de deficiencia general de IgA secretora. Una deficiencia de SIgM de la mucosa puede ser un indicador fuerte de la general de IgM secretora. Una deficiencia combinada de SIgA/SIgM es un indicador fuerte de una deficiencia combinada general de IgA e IgM secretoras.

Indica una deficiencia de SIg en particular si el nivel de SIg en la mucosa es menor de 50% en comparación con un valor de referencia, que es un valor normal o un valor de sujetos sanos del mismo tipo, específicamente menor de 40%, 30%, 20% o 10%.

- 35 Hay una variación considerable en los niveles de inmunoglobulinas secretoras en diferentes individuos. Una medición exacta del estado inmunológico de un individuo puede establecer primero el valor base de los valores SIgA y/o SIgM habituales para el individuo durante un período de días a semanas durante un período de buena salud y actividad física baja a moderada. El valor base también puede variar con la edad del individuo. Sin embargo, este método no es factible para personas con inmunodeficiencia secretora crónica. Por lo tanto, también se pueden considerar valores de referencia para poblaciones normales.

- 40 Para seres humanos, el nivel de SIgA salival normal es de 11-65 mg/dl, el nivel de SIgM salival normal es de 1 mg/dl. Los valores normales de SIg típicamente se determinan en muestras de sujetos sanos. La inmunoglobulina salival disminuida puede estar presente en niños con infección respiratoria superior recurrente, deficiencia selectiva de IgA y/o IgM y ocasionalmente en personas con alergias alimentarias.

- 45 La deficiencia de SIgA en muestras de saliva humana determinada por inmunoensayos se indica típicamente si la concentración de SIgA es menor que 100 miligramos de SIgA por litro o un caudal de SIgA salival menor que 50 microgramos de SIgA por minuto o una relación de SIgA a albúmina menor que 4 (según lo propuesto por Dwyer et al. en *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 2010, volumen 81, páginas 582 y sigs.) La deficiencia de SIgA en heces humanas determinada por inmunoensayos se indica típicamente si la concentración de SIgA es menor que 10 miligramos por 100 g de heces.

- 50 La deficiencia de SIgA en lágrimas humanas determinada por inmunoensayos, se indica típicamente si la concentración de SIgA es menor que 50 mg de SIgA por mililitro.

La deficiencia de SIgM en secreciones nasales o saliva humanas, determinada por inmunoensayos, se indica típicamente si la concentración de SIgM es menor que 50 mg por litro en las secreciones nasales y/o la concentración de SIgM es menor que 1 mg/dl en la saliva.

5 El nivel disminuido de SIg debe encontrarse solo en al menos un compartimento del tejido linfoide asociado a la mucosa con el fin de calificar la deficiencia de SIg.

La deficiencia de SIgA se puede determinar ocasionalmente en una muestra en la que también se determinó una deficiencia de SIgM. Por lo tanto, la preparación descrita en la presente memoria que comprende tanto SIgA como SIgM se usa preferiblemente en un sujeto con riesgo de deficiencia de SIgA y SIgM.

10 El término "mucoso" con respecto a una deficiencia de inmunoglobulina se refiere al nivel de inmunoglobulina determinado en muestras de mucosa, tal como muestras tomadas de la saliva, jugo gástrico, moco de cuello uterino, moco nasal, lavado intestinal, jugo gástrico, lavado bronquial, orina, lágrimas y heces, de un sujeto.

15 El término "mucoso" con respecto a la administración o aplicación u otro uso de mucoso de una preparación para tratar un sujeto o una formulación respectiva, se refiere a la administración por vía mucosa, incluyendo la administración sistémica o local, en la que un principio activo se toma por contacto con superficies mucosas. Esto incluye administración oral, nasal, vaginal, rectal bronquial y formulaciones p. ej. de líquido, jarabe, pastilla, comprimido, tal como un comprimido efervescente, un aerosol, formulación de inhalador, polvo, polvo instantáneo, gránulos, supositorio, cápsulas, crema, pasta, gel, gotas, suspensión, emulsión o producto alimenticio, incluidos los productos lácteos y chicle.

20 El término "sujeto", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal, que en esta memoria incluye preferiblemente mamíferos y en particular seres humanos, para los que se contempla el diagnóstico, determinación, vigilancia o tratamiento. Un sujeto puede estar en riesgo de una determinada enfermedad, p. e., un paciente aquejado de una enfermedad o para el que se va a determinar una enfermedad o se va a determinar el riesgo de una enfermedad. El término "paciente" tal como se usa en la presente memoria siempre incluye sujetos sanos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir seleccionar un sujeto que necesita una terapia complementaria SIg, tal como un sujeto con deficiencia comprobada de SIg, y tratar adicionalmente dicho sujeto descrito en la presente memoria.

25 La expresión "en riesgo de" ciertas afecciones, tal como deficiencia de SIg o deficiencia de inmunoglobulina de la mucosa, se refiere a un sujeto que potencialmente desarrolla dicha afección, p. ej., por una cierta predisposición, o ya padece dicha afección en diferentes etapas, que incluyen el estado congénito o adquirido, que incluyen enfermedad transitoria, particularmente asociada con otros factores de afecciones o complicaciones posteriores como consecuencia de dicha deficiencia de inmunoglobulina.

La determinación del riesgo y el diagnóstico de una deficiencia de Ig en la mucosa son particularmente importantes en un sujeto, donde la deficiencia de Ig aún no ha sido diagnosticada. Por lo tanto, esta determinación de riesgo incluye el diagnóstico precoz para permitir la terapia profiláctica.

35 Específicamente, la preparación descrita en la presente memoria se usa en pacientes con un riesgo alto, p. ej. una probabilidad alta de deficiencia de Ig en mucosa sin síntomas (p. ej., niños menores de 4 años, personas poco antes y después de cirugía, antes y después de un estrés físico extenso como deportes o trabajo de alto rendimiento o cuando se viaja con un mayor riesgo de infección por patógenos).

40 La evaluación de riesgos y, en particular, el tratamiento de la deficiencia de Ig en mucosa descrita en la presente memoria están particularmente indicados con enfermedades infecciosas de la boca, garganta, nariz y oídos, ojos y esófago, el tracto gástrico y el colon.

45 Un uso preferido adicional es la prevención de una afección causada por un patógeno, que incluye sustancias u organismos microbianos, antígenos o agentes causantes de enfermedades, tales como toxinas. Por ejemplo, los pacientes hospitalizados pueden necesitar complementar su sistema inmunitario para reducir el riesgo de una infección adquirida en el hospital. Los seres humanos o animales neonatos que reciben un complemento alimenticio descrito en la presente memoria pueden tener una mayor probabilidad de supervivencia en caso de que no puedan obtener suficiente leche materna de las madres o sus respectivas nodrizas. Además, el riesgo de enfermedad enteropatógena en animales y seres humanos se puede reducir mediante un producto alimenticio descrito en la presente memoria. Específicamente, cuando un sujeto padece deficiencia de SIg, los patógenos pueden inducir un efecto hiperóxico, es decir, una afección tras estimulación con una dosis de un agente causante de enfermedad, que de otro modo no causaría dicha enfermedad. La preparación descrita en la presente memoria, por lo tanto, se proporciona específicamente para evitar dicho efecto hiperóxico en sujetos con riesgo de o que padecen deficiencia de SIg.

55 Por lo tanto, aquí se describe un nuevo método para producir una preparación de inmunocomplejo, que tiene la gran ventaja de proporcionar una preparación estable de alta calidad en cantidades suficientes mediante la producción a escala industrial. Se proporcionan nuevas preparaciones de SC recombinante e inmunocomplejos con calidad mejorada.

De este modo, se puede proporcionar un inmunocomplejo innato, que es específicamente útil como un producto alimenticio, un producto de bienestar para restablecer y mantener una fisiología equilibrada o para fines médicos, que incluye usos terapéuticos y profilácticos.

5 Resultó que la fucosa no central, específicamente los glicanos de Lewis, tienen una función importante también como parte de la inmunidad innata de los organismos. Se estudia en detalle la elucidación de las interacciones entre estructuras de patógenos, tales como antígenos de superficie, toxinas o receptores y estructuras de glicanos del hospedante.

10 En particular, la glicosilación de Lewis puede interactuar con la unión de *Helicobacter pylori* a las células del hospedante. Más del 80% de las cepas de *H. pylori* expresan antígenos de Lewis Tipo II (LeX y/o LeY), y la mitad de ellos expresa ambos. Una menor proporción de cepas de *H. pylori* expresan antígenos del grupo sanguíneo de Lewis de Tipo I (LeA y/o LeB) y un número muy pequeño expresa sialyl-LeX.

De manera similar, sialyl-LeX es expresado en la superficie celular de algunas bacterias orales que están asociadas con endocarditis infecciosa, como *Streptococcus pyogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Eikenella corrodens*.

15 Los norovirus son agentes causantes, p. ej. de gastroenteritis aguda. Se unen a antígenos de grupo histo-sanguíneo (HBGA) en células hospedantes, en concreto, antígenos ABH y antígenos de Lewis, en los que las estructuras centrales de hidratos de carbono de tipo 1 y tipo 2 constituyen variantes antigénicamente distintas. Los norovirus humanos reconocen la neoglicoproteína sialyl Lewis x.

20 La toxina A de *Clostridium difficile* y la intimina de *E. coli* enteropatógeno se unen a los restos de galactosilo y/o ácido siálico de SC. Se ha mostrado que DC-SIGN en células dendríticas de mucosa actúa como un receptor putativo para SIgA, y que las células dendríticas podrían así colaborar con las células M en la vigilancia inmunitaria en las superficies de mucosa.

25 Se describe además en la presente memoria el descubrimiento de que se puede encontrar una glicosilación de tipo humano de un SC en individuos seleccionados de especies no humanas, y que dicho SC de tipo humano se usa preferiblemente en combinación con una inmunoglobulina natural que tiene el patrón de glicosilación natural que es útil para estabilizar el SC de tipo humano y preservar las funciones naturales de una inmunoglobulina secretora. Resultó que el patrón de glicosilación de SC dentro de la misma especie varía en un amplio intervalo, por lo tanto, mezclas grandes de donaciones que se usan típicamente para preparar productos lácteos no contendrían un nivel significativo de N-glicosilación con epítomos de Lewis en el SC aislado. Dichas mezclas a gran escala comunes no serían útiles como material fuente para el propósito de la invención. Sin embargo, en algunos individuos, el SC puede tener un nivel alto de epítomos Lewis de tipo humano. Esos individuos serían aptos para preparar mezclas de producción grandes que se pueden usar como material fuente para fabricar el inmunocomplejo como se describe en la presente memoria a gran escala. Alternativamente, el respectivo SC de tipo humano se puede producir por métodos de producción recombinantes. El SC obtenido del material fuente se combina a continuación con IgA o IgM, que incluye específicamente moléculas de inmunoglobulina polimérica que tienen un patrón de glicosilación natural, en particular las que comprenden cadenas de inmunoglobulina que están fucosiladas de forma no central. Las inmunoglobulinas poliméricas se pueden obtener de fuentes naturales tales como la leche o el plasma sanguíneo o se pueden producir de forma recombinante. Alternativamente, los inmunocomplejos descritos en la presente memoria que comprenden el SC y la inmunoglobulina se pueden aislar y purificar directamente de mezclas de producción grandes, p. ej. seleccionados por su contenido de fucosa no central o epítomos de Lewis. Por lo tanto, se puede preparar la preparación del inmunocomplejo, que comprende el SC estabilizado en la medida en que proporciona el producto estable en el almacenamiento o la preparación del inmunocomplejo con una estabilidad aumentada in vivo, lo que da como resultado en una mayor recuperación en la mucosa y/o la semivida.

45 Se pueden producir variaciones de glicosilación en un estado fisiológico diferente de la célula u organismo que produce el SC, p. ej. infecciones, presencia de factores inflamatorios, suministro de alimentos y nutrición, estrés, etc. Una fuente adicional de variación de glicosilación en una mezcla puede ser un contexto genético diferente y la composición de los organismos o células individuales que producen el SC (como especies, raza, grupos sanguíneos, genotipo y haplotipo de plgR, etc.). Los métodos analíticos adecuados para determinar el patrón de glicosilación se describen, p. ej. en Deshpande et al. (*J. Proteome Res.* 2010, 9, 1063-1075).

50 La leche humana contiene epítomos de Lewis, se ha descrito que también la leche de cerdo, caballo y otras especies contiene glicoproteínas con antígenos de Lewis. Las α 1,2- y α 1,3/4-fucosiltransferasas de mamíferos están implicadas en las últimas etapas de la síntesis de antígenos del grupo sanguíneo A, B y H Lewis y antígenos de hidratos de carbono relacionados con el grupo sanguíneo de Lewis (es decir, LeX, LeY, LeA, LeB, sialyl-LeX y sialyl-LeA). Aun así, no fue posible proporcionar el inmunocomplejo SC o SC glicosilado fucosilado no central o Lewis con inmunoglobulinas a escala industrial.

Sorprendentemente se pueden identificar sistemas de expresión individuales, tales como clones de células o animales, organismos o microorganismos recombinantes que producen significativamente más del SC Lewis-fucosilado no central frente al SC fucosilado central que la media en la mezcla heterogénea de glicofomas de SC

(libre o unido a inmunoglobulinas). La diferencia entre clones individuales o animales puede ser inesperadamente alta.

Es un hallazgo sorprendente que la fucosilación no central tiene una función en la unión de SC recombinante a la toxina A de *Clostridium difficile*. Esto está en contraste con Perrier et al. 2006 *J Biol. Chem.* vol. 281 (20), pág. 14280-14287 quien concluyó que los residuos restos fucosa no están implicados en la asociación.

Otro hallazgo sorprendente es que el nivel de ciertos motivos de glicosilación se puede correlacionar con la potencia de SC para neutralizar ciertos antígenos patógenos.

Otro hallazgo sorprendente es que el nivel de unión al receptor DC-SIGN varía fuertemente entre muestras de leche individuales y que en la unión de SC a DC-SIGN influyen los glicanos de Lewis a pesar de la presencia de glicanos con alto contenido de manosa complejos.

El producto de expresión que comprende el SC fucosilado no central o fucosilado de Lewis como se ha descrito antes, se combina preferiblemente y se usa como fuente para la preparación del inmunocomplejo descrito en la presente memoria.

En realidad, el SC de tipo humano como se describe en la presente memoria, que proviene de fuentes distintas de la leche materna humana, tiene propiedades similares o incluso mejoradas en comparación con el SC natural humano con una actividad de neutralización de amplio espectro frente a muchos patógenos. Como se usa en la presente memoria, el término "patógeno" siempre incluye organismos microbianos y toxinas, que también incluyen células y productos bacterianos, fúngicos, víricos y protozoarios, en particular patógenos humanos o veterinarios.

Se prefiere que la preparación descrita en la presente memoria comprenda un título alto de una mezcla relevante de inmunoglobulinas que mantenga su función natural incluyendo el paso de la mucosa después de la ingestión oral.

La preparación de inmunocomplejo descrita en la presente memoria tiene la ventaja de alta potencia debido a la elevada cantidad normalizada de fucosas no centrales o epítomos de Lewis en el patrón de N-glicosilación del SC. De este modo, el efecto anti-patógeno, que incluye el efecto antimicrobiano o antitoxina, de la preparación del inmunocomplejo se puede aumentar significativamente.

Los principales criterios de selección se refieren al tipo y a la cantidad de los epítomos de Lewis que han demostrado conferir la inmunidad deseada. Los epítomos de Lewis preferidos son epítomos de LeB, que son significativamente mayores con respecto a la prevalencia promedio en fuentes naturales. También se prefiere la aparición de epítomos de Lewis x y Lewis x sialilado en el SC. El aumento relativo preferido en un producto derivado de leche es al menos un aumento en la señal de ELISA que supera la señal de una fuente mezcla de individuos no seleccionados, cuyo tamaño de mezcla deriva de al menos 100 individuos por un factor de 2 veces la desviación estándar de muestras no seleccionadas. Típicamente, una mezcla de productos de glándulas mamarias derivada de al menos 100 individuos, en particular de rumiantes, como vacas, ovejas o cabras, tiene un promedio significativamente por debajo de 0,01 mol de fucosa no central o epítomos de Lewis/mol de SC, normalmente por debajo de 0,005 mol/mol, en la mayoría de los casos incluso antígenos de Lewis indetectables según se determinar por técnicas de ELISA convencionales.

Sin embargo, en la presente memoria se describe la selección preferida de líquidos sobrenadantes de cultivo o extractos celulares de acuerdo con su calidad con respecto a las fucosas no centrales o epítomos de Lewis, que son al menos 2 mol/mol de SC, y específicamente al menos 1%, preferiblemente al menos un 5% o al menos 10% de fucosa no central o epítomos de Lewis del valor teórico. La selección todavía más preferida se realiza de acuerdo con niveles de glicosilación de fucosa no central o de Lewis superiores, por ejemplo, al menos 2 mol/mol de SC, al menos 3 mol/mol de SC, 4 al menos mol/mol de SC, o al menos 5 mol/mol de SC, al menos 6 mol/mol de SC, al menos 7 mol/mol de SC, al menos 8 mol/mol de SC, al menos 9 mol/mol de SC, o al menos 10 mol/mol de SC. En casos específicos, el número teórico de sitios de N-glicosilación asciende a 2 (SC bovino natural), 3 (SC equino natural) y 7 (SC humano natural) mol/mol. Como se describe en la presente memoria, se prefiere específicamente que la selección se realice de acuerdo con la cantidad de epítomos de Lewis que son al menos 1%, preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% del número teórico de sitios de glicosilación, más preferido al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% hasta el número teórico de sitios de glicosilación.

La cantidad de fucosa no central puede superar la cantidad teórica de sitios de N-glicosilación, p. ej. por fucosilación múltiple por sitio de N-glicosilación, obteniendo de ese modo más epítomos de Lewis que el número de sitios de N-glicosilación en una base molar, p. ej. al menos 1,1 veces, preferiblemente al menos 1,2 veces, o al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces, o al menos 2 veces, en un caso específico, la cantidad es incluso mayor, p. ej. al menos 3 veces, o al menos 4 veces, o al menos 5 veces, o al menos 6 veces, o al menos 7 veces, o al menos 8 veces, o al menos 9 veces, p. ej. hasta 10 veces la cantidad teórica de sitios de N-glicosilación.

En la siguiente sección de ejemplos se describen sistemas de ensayo de ejemplo para determinar la fucosa no central en SC y/o SigA o SigM. Un método de determinación altamente sensible se refiere al análisis de glicanos por RP-ESI-MSMS estándar (también denominado RP-HPLC-ESI-MSMS, - cromatografía líquida de alta resolución de

fase inversa - ionización por electropulverización - espectroscopía de masas en tándem). El nivel o grado de fucosilación no central o fucosilación de tipo Lewis se puede ensayar basándose en el siguiente principio:

5 El perfil de glicanos y, por lo tanto, la cantidad de una determinada composición de los oligosacáridos unidos a un sitio de glicosilación dado se puede determinar por espectrometría de masas de glicopéptidos derivados del SC (Stadlmann 2008, *Proteomics* 8, 2858-2871; Wuhler 2007, *Proteomics* 7, 4070-4081) En el caso particular de restos de fucosa unidos a las antenas de glicanos (glicosilación de Lewis) en SC con varios sitios de glicosilación potenciales, se puede aplicar la siguiente estrategia.

10 La preparación de SIgA se separa en una SDS-PAGE y se eluye la banda de SC. El SC se S-alquila y se digiere con tripsina u otra proteasa adecuada. La muestra se somete adicionalmente a tratamiento con una fucosidasa capaz de eliminar específicamente restos de fucosa con enlace alfa-1,6 con el resto de GlcNAc más interno (fucosilación central). Un ejemplo de dicha enzima es la fucosidasa de riñones bovinos.

15 La mezcla resultante de péptidos y glicopéptidos después se analiza por espectrometría de masas, preferiblemente después de la separación cromatográfica mediante, p. ej. cromatografía de fase inversa. Con la elección adecuada de la proteasa, la columna de cromatografía y el gradiente de disolventes, cada sitio de glicosilación está representado entonces por un pico. Los sitios potenciales de glicosilación unidos a Asn se pueden deducir a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Puesto que la retención en la mayoría de las columnas de fase inversa, p. ej. en una columna Waters BioBasic C18, se basa únicamente en el resto peptídico, este pico cubre todas las glicofomas de un péptido dado y, por lo tanto, el sitio de glicosilación.

20 Los glicopéptidos de un sitio dado se pueden identificar de varias maneras:

1.) Debido a la heterogeneidad habitualmente observada, forman una serie de picos que difieren en la masa de, p. ej. una hexosa (162,05 Da), un ácido siálico (291,09 Da), una N-acetilhexosamina (203,08 Da) o un resto de fucosa (146,06 Da).

25 2.) La fragmentación de MSMS por ESI o MALDI-MS puede poner de manifiesto la secuencia de los glicanos y la masa del péptido subyacente

3.) Eliminación enzimática por péptido: la N-glicosidasa (F o A) generará el péptido desglucosilado que contiene un Glu (ácido glutámico) en lugar de un resto de Gln (glutamina), lo que da como resultado una diferencia de masa de 1 Da. La masa de este péptido desglucosilado debe coincidir con los supuestos obtenidos o usados en los puntos 1.) y 2.).

30 Una vez que se identifican los picos de glicopéptidos, el "volumen" de los picos, es decir, el área bajo los picos que corresponden a una especie de glicopéptido particular se mide por un método adecuado, que puede tener en cuenta que a menudo se produce un analito en dos o más estados de carga. El volumen del pico se puede traducir directamente en proporciones molares de glicofomas ya que la ionización y, por lo tanto, la detección de los glicopéptidos está dominada por la parte del péptido (Stadlmann, 2008, *Proteomics* 8, 2858-2871).

35 De la lista de glicofomas que se produce en un sitio particular, se calcula la fracción molar de glicanos fucosilados. Los resultados para los diferentes sitios se suman para llegar a la proporción molar en la que se produce una característica estructural particular en la muestra SC particular. La integridad de la eliminación fucosa central se puede verificar, p. ej. mediante el análisis de los N-glicanos liberados por cromatografía sobre carbón grafito poroso con detección de MS (Pabst 2007, *Anal. Chem.* 79, 5051-5057).

40 Para seleccionar un gran número de fuentes o preparaciones individuales, se puede usar un ensayo simple y rápido, tal como un ensayo de flujo lateral. Además o alternativamente, se usa un ensayo ELISA empleando un ligando específico de glicosilación de tipo Lewis, tal como anticuerpos o ligandos de armazón alternativos contra diversos epítomos de Lewis (p. ej., anti-Lewis a, anti-Lewis b, anti-Lewis x, anti-Lewis y, anti-sialyl Lewis x), la lectina humana DC-SIGN, la molécula de adhesión intercelular no asociada a integrina específica de células dendríticas, también conocida como CD209 (agrupación de diferenciación 209). Ejemplos de otras lectinas que se unen a los epítomos de Lewis posiblemente usados son isolectina A, aglutinina de *Aleuria aurantia*, trombomodulina, langerina, receptor depurador lectina de tipo C, E-selectina, siglecs, receptores de SIG- y proteína vírica8 (VP8) de rotavirus humanos.

45 Como control positivo típicamente se usa material humano. Como control negativo, se usan proteínas no fucosiladas, tales como BSA o cualquier preparación de inmunoglobulina secretora de una fuente comercial de mezcla (es decir, no seleccionada, no humana), cuya fuente comprende un promedio de menos de 0,01 mol de fucosa no central por mol de SC en cualquier caso. Los resultados de determinar la fucosa no central o epítomos Lewis en la preparación de SC y/o inmunoglobulina secretora se comparan típicamente con una referencia con una cantidad predeterminada de fucosa no central por mol de SC o SIgA o SIgM, tal como 0,01 mol/mol (+/- 20%). Por lo tanto, los resultados pueden ser semicuantitativos y se refieren a "mayor que" o "menor que" la cantidad de
55 referencia. Alternativamente, la determinación cuantitativa será posible, p. ej. por calibración adecuada con una serie de referencias que comprenden diferentes niveles de fucosilación no central o epítomos de Lewis. La prueba de

- potencia estándar se refiere a la actividad de neutralización o ensayos de unión de al menos uno de toxina A de *Clostridium difficile*, *Helicobacter*, toxinas de *E. coli*, *Campylobacter*, *Shigella*, Rotavirus, Norovirus o inhibición de unión competitiva, u otras interacciones con lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, peptidoglicano, hemocianina de lapa californiana, DC-SIGN, isolectina A, aglutinina de *Aleuria aurantia*, trombomodulina, langerina, receptor depurador de lectina de tipo C, E-selectina, siglecs, receptores de SIGN.
- 5 El SC o el inmunocomplejo se puede obtener de material fuente en forma purificada para preparar el producto de inmunocomplejo descrito en la presente memoria.
- Los sistemas de expresión usados alternativamente para producir el inmunocomplejo descrito en la presente memoria también pueden ser sistemas de expresión recombinantes, entre ellos células hospedantes recombinantes de todas las especies y taxones, p. ej. hospedantes eucariotas recombinantes.
- 10 Por lo tanto, se puede usar una secuencia de aminoácidos, tal como la SEQ ID 1 o cualquier secuencia variante funcionalmente activa de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifique un SC, para preparar un hospedante recombinante. Las secuencias codifican preferiblemente un SC de origen mamífero, tal como humano, que siempre incluye variantes funcionales. La información de secuencia respectiva se proporciona en las figuras o se puede obtener de bases de datos públicas, según corresponda.
- 15 El SC recombinante hasta la fecha se ha producido en hospedantes que no pueden añadir fucosilación de tipo Lewis a los glicanos del componente secretor. Los hospedantes para SC recombinante purificado que se usaban normalmente eran células CHO, células BHK, células J558L de ratón, células de insecto y plantas de tabaco.
- El SC recombinante se puede producir por introducción del gen completo de plgR, p. ej. plgR humano, en células hospedantes, expresión posterior de la proteína transmembrana plgR seguido de una escisión y liberación de la parte extracelular, el SC, en el líquido sobrenadante del cultivo. Una expresión alternativa es la transcripción de la secuencia de nucleótidos del SC, es decir, solo los dominios extracelulares, tal como codificar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID 1. En todos los casos, la expresión de SC recombinante permite la selección exacta de las condiciones de producción que garantizan un extremo C homogéneo del producto final.
- 20 También permite elegir el sitio de finalización de la traducción según las necesidades. Preferiblemente, el codón de terminación en el gen de SC que se va a expresar está localizado entre la codificación del último dominio similar a la inmunoglobulina extracelular (es decir, el dominio 5 en SC humano) y la región transmembrana. Sin embargo, el SC recombinante descrito en la presente memoria puede ser incluso más corto, p. ej. que comprende menos de 5 dominios completos, o menos de 4 dominios, o menos de 3 dominios, o menos de 2 dominios, p. ej. al menos el primer dominio, siempre que sea capaz de unirse y contener el nivel requerido de fucosa no central.
- 25 Los primeros 18 aminoácidos en la SEQ ID 1 comprenden el péptido señal que se puede reemplazar por un péptido señal diferente dependiendo de las células hospedantes u organismos usados y la eficacia de secreción requerida. Para la producción por síntesis química o producción intracelular de SC, no se requiere el péptido señal (p. ej., para la producción de la forma no glicosilada en cuerpos de inclusión de *E. coli*). La proteína también se puede modificar para contener aminoácidos adicionales en el extremo C de la SEQ ID 1.
- 30 La proteína se puede terminar mediante un codón de terminación en la posición requerida en el ácido nucleico, respectivamente después del aminoácido G545, preferiblemente en cualquier sitio de aminoácido entre K566 y E607 (incluidos estos sitios), más preferido entre R603 y E607 (incluidos estos sitios) o después de E607. Más preferiblemente, el SC termina después de R603. La numeración se refiere a la SEQ ID 1.
- 40 Preferiblemente, la preparación de SC descrita aquí es homogénea, en la que al menos 80%, o al menos 90%, o al menos 95%, hasta 100% de las moléculas de SC tienen el mismo extremo C.
- El patrón de glicanos del SC recombinante depende de la especie hospedante, el organismo hospedante, el tejido de origen y el estado fisiológico de la célula genéticamente modificada.
- 45 Preferiblemente, la célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en células humanas tales como PerC.6, células de ovario de hámster chino, células de riñón de hámster bebé, células murinas, líneas celulares aviarias, células bacterianas, de levaduras, hongos, plantas e insectos. De este modo, se puede obtener un SC recombinante con la fucosilación no central o la N-glicosilación de tipo Lewis deseada.
- El grado de fucosilación no central en una preparación descrita en la presente memoria se puede aumentar mediante la selección para SC con una fucosilación no central alta (por mol de SC). Esto se puede hacer al nivel de selección de un hospedante de producción (tal como el cribado de una línea celular, un clon microbiano o un organismo). La fucosilación se puede aumentar por fucosilación enzimática o química de una preparación de SC o un inmunocomplejo innato descrito en la presente memoria.
- 50 El tejido normal muestra la expresión de epítomos de Lewis en ciertos sitios (p. ej., colon, testículo) y durante ciertas etapas de desarrollo (antígenos fetales). Por consiguiente, ciertas líneas celulares de ciertos sitios, p. ej. las líneas celulares de carcinoma de colon expresan antígenos de Lewis. Las células Caco-2 solo expresan el antígeno de
- 55

- 5 grupo sanguíneo H tipo 1 y una pequeña cantidad de LeB durante la diferenciación. Se han explorado diversas líneas celulares (HT-29, AGS, Kato III, HuTu-80 y HEp-2), así como células gástricas primarias, para la expresión del antígeno de Lewis. Sin embargo, muchos de ellos son difíciles de cultivar y no serían adecuados como un hospedante de producción para producir la respectiva N-glicosilación de tipo Lewis debido a su inestabilidad genética inherente.
- 10 Los N-glicanos vegetales están en forma de tipos oligomanosídicos (Man>5GlcNAc2), paucimannosídicos y complejos. El resto LeA, localizado en las antenas de N-glicanos, se ha detectado no solo en monocotiledóneas y dicotiledóneas, sino también en *Physcomitrella patens* (un musgo monoico) y varias especies de briofitas. LeA se expresa en todos los tejidos vegetales (flores, hojas, raíces y plántulas), la actividad responsable de α 1,4-FucT es predominante en tejidos jóvenes (hojas y raíces). Sin embargo, la SIgA expresada en plantas hasta el momento no ha mostrado ninguna glicosilación de tipo Lewis.
- 15 La coexpresión de inmunoglobulina polimérica (tal como IgA dimérica o IgM pentamérica) y SC en el mismo hospedante capaz de producir proteínas N-glicosiladas con epítomos de Lewis conduce a cadenas pesadas glicosiladas de Lewis que no son naturales y, por lo tanto, no preferidas.
- 20 Por lo tanto, se prefiere específicamente que se usen sistemas de expresión que pueden glicosilar glicoproteínas de la manera deseada, *per se*, es decir, de forma hereditaria, o también mediante la capacidad adquirida o transitoria a través de modificaciones genéticas respectivas, p. ej. mediante técnicas de recombinación para proporcionar el patrón de glicosilación respectivo. Los sistemas de expresión de ejemplo tienen una capacidad mejorada para producir N-glicoproteínas fucosiladas de Lewis, p. ej. a través de la expresión concomitante de fucosiltransferasa 2 y 3 y beta 1,3-galactosiltransferasa I, II y V.
- 25 Los hospedantes que se modifican genéticamente para producir oligosacáridos y glicoconjugados fucosilados no centrales o glicosilados de Lewis son, por ejemplo, líneas celulares de producción para expresar diversas glicosiltransferasas tales como fucosiltransferasas con el fin de producir oligosacáridos, glicoproteínas o glicolípidos con antígenos relacionados con el grupo sanguíneo.
- 30 Se ha descrito que los animales transgénicos generan glicosilaciones relacionadas con el grupo sanguíneo (p. ej., documento WO1995024495A1 o Xu et al. véase antes). Los organismos transgénicos de la técnica anterior, sin embargo, proporcionarían IgA o IgM con fucosilación de Lewis de forma concomitante, que presentarían una fucosilación no central excesiva y un patrón de glicosilación no natural. Por lo tanto, la preparación del inmunocomplejo no deriva específicamente de la leche de dichos animales transgénicos.
- 35 Se ha descrito que las células CHO modificadas genéticamente generan fucosilación tipo Lewis (Löfling et al. 2008, *Glycobiology* vol. 18 n° 7 pág. 494-501). También se han descrito mutantes de ganancia de función de células CHO con capacidad de generar N-glicanos fucosilados de tipo Lewis (North et al. 2010, *J Biol Chem.* vol 285 pág. 5759-5775). Sin embargo, la expresión de SIgA completa en dichas células hospedantes conduciría a cadenas de alfa-inmunoglobulina fucosiladas de Lewis con glicosilación no natural. Por lo tanto, dichas células solo se pueden usar para producir SC de tipo humano, después de la selección de glicosilación adecuada como se describe en la presente memoria. La selección de clones de células hospedantes recombinantes adecuados se realiza como se describe para el cribado de muestras de leche como se ha descrito antes. Se prefiere modificar genéticamente, cribar y seleccionar más glicosilaciones de tipo Lewis diferentes y más mutantes genéticamente estables que los descritos por Löfling et al. y North et al. El SC recombinante derivado de dichas células hospedantes después se usa para preparar inmunocomplejos descritos en la presente memoria con inmunoglobulina fucosilada no tipo Lewis (es decir, glicosilación natural) de cualquier fuente.
- 40 Específicamente, se prefiere cultivar una línea de células hospedantes recombinantes en un biorreactor a escala piloto o industrial usando condiciones para expresar SC con glicosilación de Lewis con rendimientos de al menos 1 mg/l de medio de cultivo, preferiblemente al menos 10 mg/l, preferiblemente al menos 100 mg/l, lo más preferido al menos 1 g/l.
- 45 La célula hospedante descrita en la presente memoria se ensaya preferiblemente para determinar su capacidad de expresión o rendimiento mediante la siguiente prueba: ELISA, ensayo de actividad, HPLC, u otros ensayos adecuados que muestran la cantidad y calidad de SC o inmunocomplejo descrito en la presente memoria. La célula hospedante se selecciona no solo según los niveles de expresión sino también según el patrón de glicosilación de SC que puede proporcionar: p. ej. se va a encontrar al menos uno de Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y o sus formas sialiladas en el SC recombinante. Preferiblemente, está presente Lewis x y/o sialil-Lewis x en una muestra. Más preferible, está presente más de un tipo de antígenos de Lewis en el SC en una muestra.
- 50 Las técnicas de fermentación preferidas son de cultivo discontinuo, discontinuo alimentado o continuo tales como cultivo de perfusión.
- 55 Preferiblemente, la línea celular de producción se cultiva en un medio mineral con una fuente de carbono adecuada, simplificando así más el procedimiento de aislamiento de forma significativa. Un ejemplo de un medio mineral preferido es uno que contiene una fuente de carbono utilizable (p. ej., glucosa, glicerol o metanol), sales que contienen los macroelementos (potasio, magnesio, calcio, amonio, cloruro, sulfato, fosfato) y oligoelementos (cobre,

yoduro, manganeso, molibdato, cobalto, zinc y sales de hierro, y ácido bórico), y opcionalmente vitaminas o aminoácidos, p. ej., para complementar auxotrofías.

5 Las células transformadas se cultivan en condiciones que son adecuadas para realizar la expresión del SC que se puede purificar de las células o del medio de cultivo, dependiendo de la naturaleza del sistema de expresión. Como entenderá el experto en la técnica, las condiciones de cultivo variarán de acuerdo con factores que incluyen el tipo de célula hospedante y el vector de expresión particular usado.

10 Si el SC es secretado de las células, se puede aislar y purificar del medio de cultivo usando técnicas del estado de la técnica. La secreción de los productos de expresión recombinantes es generalmente ventajosa por razones que incluyen facilitar el procedimiento de purificación, ya que los productos se recuperan típicamente del líquido sobrenadante del cultivo en lugar de la mezcla compleja de proteínas que resulta cuando las células se rompen para liberar proteínas intracelulares.

Las células transformantes cultivadas también se pueden romper por ultrasonidos o de forma mecánica, enzimática o química para obtener un extracto celular que contiene el SC deseado, a partir del cual se aísla y se purifica el SC.

15 Además de las técnicas de ingeniería genética, también se puede proporcionar el SC de tipo humano por conjugación química de oligosacáridos glicosilados de Lewis a SC, adición enzimática de fucosa para generar antígenos de Lewis en SC in vitro, o enriquecimiento de SC o inmunoglobulinas secretoras a partir de fuentes mezcladas mediante la unión de ligando específica de glicosilación de Lewis (p. ej., anticuerpos o armazones alternativos que se unen específicamente a antígenos de Lewis, lectinas específicas tales como DC-SIGN, trombomodulina, isolectina A de *Lotus tetragonolobus* y aglutinina de *Aleuria aurantia*, ciertos siglecs, selectinas).

20 Los métodos de aislamiento y purificación usados para obtener un SC o inmunocomplejo descritos en la presente memoria pueden usar diferencias en la solubilidad, tales como precipitación salina y precipitación con disolvente, diferencias en el peso molecular, tales como ultrafiltración y electroforesis en gel, diferencias en la carga eléctrica, tales como cromatografía de intercambio iónico, o pueden usar afinidades específicas, tales como cromatografía de afinidad, o pueden usar diferencias en hidrofobicidad, tales como cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, o usar diferencias en el punto isoeléctrico, tales como el enfoque isoeléctrico. Las etapas de purificación específicas que se usan preferiblemente para separar cualquier polipéptido SC solo o en complejo con inmunoglobulinas, son técnicas de ultrafiltración con cortes de exclusión de peso molecular entre 100 kDa y 500 kDa y técnicas de precipitación tales como precipitación con sales tales como sulfato de amonio o disolventes orgánicos.

30 El SC aislado y purificado se puede identificar y analizar por métodos convencionales tales como transferencia o ensayo Western de su actividad, p. ej. por su capacidad para unirse a la IgA dimérica o la cadena J o por detección con antisueros específicos contra el SC.

35 La estructura del compuesto purificado se puede definir por análisis de aminoácidos, análisis amino terminal, análisis de estructura primaria, glicoanálisis y similares. Se prefiere que el compuesto SC se pueda obtener en grandes cantidades y en casos específicos con una alta pureza, cumpliendo así los requisitos necesarios para ser usado como parte de un inmunocomplejo descrito en la presente memoria para usarse como un principio activo en composiciones farmacéuticas.

La preparación del inmunocomplejo descrita en la presente memoria se usa preferiblemente como un producto alimenticio, p. ej. para proporcionar una dieta específica a sujetos que lo necesitan, que, p. ej. están en riesgo o que padecen una afección causada por un patógeno.

40 Un uso preferido adicional es la prevención de una enfermedad o trastorno causado por un patógeno, que incluye sustancias u organismos microbianos, antígenos o agentes causantes de enfermedades, tales como toxinas. Por ejemplo, los pacientes hospitalizados pueden necesitar complementar su sistema inmunitario para reducir el riesgo de una infección adquirida en el hospital. Los seres humanos o animales neonatos que reciben el complemento alimenticio descrito en la presente memoria pueden tener una mayor probabilidad de supervivencia en caso de que no puedan obtener suficiente calostro de las madres o las respectivas nodrizas. Además, dicho producto alimenticio puede reducir el riesgo de enfermedad enteropatógena en animales y seres humanos.

La preparación descrita en la presente memoria se puede usar para tratar enfermedades infecciosas de la boca, garganta, nariz y oídos, los ojos y el esófago, el tracto gástrico y colon.

50 Adecuadamente, la preparación descrita en la presente memoria se puede proporcionarse en una formulación, que opcionalmente proporciona nutrientes adicionales tales como proteínas, hidratos de carbono, lípidos y otras sustancias fisiológicamente activas.

Un aspecto específico abarca la estabilización del SC de tipo humano funcional con glicosilación de Lewis por moléculas de IgA o IgM que tienen un patrón de glicosilación natural, es decir, sin epítopos de Lewis en N-glicanos.

55 El inmunocomplejo estabilizado puede tener una mayor termoestabilidad y/o estabilidad gastrointestinal, medidas por la estabilidad del pH y/o la estabilidad de la proteasa de la proteína, dando como resultado una mayor

recuperación o semivida in vivo prolongada. El efecto estabilizador es particularmente importante para la recuperación de la mucosa. Tras la administración de la preparación descrita en la presente memoria, la inmunoadividad del inmunocomplejo se puede determinar en la mucosa por técnicas inmunológicas tales como ELISA. Un nivel elevado de inmunoglobulinas en la mucosa indica una mayor recuperación.

- 5 La preparación descrita en la presente memoria puede comprender además SC no unido, libre, así como SC en complejo con inmunoglobulina, que incluso podría potenciar sus propiedades funcionales.

Una realización preferida descrita en la presente memoria es una molécula de SC descrita en la presente memoria unida a un anticuerpo natural con el fin de proporcionar una molécula poliespecífica, multivalente y proteolíticamente estable que sea capaz de neutralizar diversos antígenos de patógenos.

- 10 Se prefiere además que la preparación de inmunocomplejo descrita en la presente memoria contenga de 5 a 100% en p/p de inmunoglobulinas secretoras (es decir, poliinmunoglobulina en complejo con el SC). Más particularmente, la preparación puede contener de 20 a 70% en p/p de inmunoglobulinas secretoras.

- 15 La preparación descrita en la presente memoria también puede contener preferiblemente otros componentes tales como hidratos de carbono. Los hidratos de carbono se obtienen preferiblemente de concentrado de proteínas de suero y están presentes en la preparación en una concentración entre 0 y 95% en p/p. Más preferiblemente, los hidratos de carbono están presentes entre 30 y 90% en p/p. Los hidratos de carbono proporcionan una fuente de energía fácilmente disponible.

- 20 La dextrosa también se usa preferiblemente como un aditivo de hidrato de carbono, que se puede incluir en la preparación para ayudar a prevenir la aglomeración del polvo y proporcionar una forma adicional de hidrato de carbono.

Otros aditivos preferidos son proteínas de suero de leche, que pueden estabilizar más la preparación de inmunoglobulina, aminoácidos con fines nutricionales, oligosacáridos y sustancias que potencian el valor fisiológico de la preparación.

- 25 También se puede preferir incluir sustancias antimicrobianas en la formulación descrita en la presente memoria, tales como antibióticos, antivirales, antifúngicos, antiparasitarios o sustancias microbicidas, que incluyen ácidos orgánicos, aceites esenciales de plantas, cationes, plata coloidal o sales de amonio cuaternario.

Se prefiere en particular que la formulación descrita en la presente memoria se proporcione como un líquido, emulsión, suspensión, suspensión o en una forma seca tal como polvo o granulado.

- 30 Las formulaciones específicamente preferidas se fabrican como un polvo o granulado que se puede formular en un líquido instantáneamente antes del uso.

- 35 Otras formas de administración preferidas son comprimidos, pastillas, cápsulas, pastas, gránulos, cremas, etc. que se pueden producir por métodos estándar. Los comprimidos preferiblemente contienen aditivos auxiliares tales como cargas, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, aromatizantes o similares). Los gránulos se pueden producir usando isomaltosa. Se puede proporcionar una dosis diaria de 1 mg a 10 g de inmunocomplejo en una formulación descrita en la presente memoria para uso en seres humanos.

- 40 Se prefiere además proporcionar una preparación formulada para actuar en el sitio de la mucosa, p. ej. en los sitios de mucosa (nariz, boca, ojos, esófago, garganta, pulmón, oídos, tracto gástrico, intestino y colon), p. ej. localmente sin acción sistémica. La preparación descrita en la presente memoria típicamente se proporciona para uso oral o en la mucosa, que incluye el uso oral, nasal, bronquial, vaginal, rectal, p. ej. para inhibir la adherencia al tracto faríngeo, intestinal, genitourinario y epitelio gingival. La preparación se puede proporcionar para ciertas indicaciones médicas en una forma adecuada para aplicación tópica, tal como en una crema, pulverización o gotitas.

- 45 La preparación de inmunocomplejo descrita en la presente memoria se puede usar específicamente para tratar y/o prevenir infecciones y/o inflamación y/o síntomas alérgicos y/o síntomas de enfermedad autoinmunitaria y/o deficiencia de inmunoglobulina de las superficies mucosas, p. ej. el tracto gastrointestinal, tracto urogenital, tracto respiratorio, cavidad nasal, los ojos o la cavidad oral, en especial después de cirugía o durante la hospitalización.

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

Ejemplos

- 50 Ejemplo 1:

Cribado de muestras de leche y suero de leche para la SIgA con glicosilación de Lewis

Preparación de la muestra (leche, suero de leche)

ES 2 691 619 T3

Se toma una muestra reciente de 10 ml de leche de cabra, oveja y vaca y se centrifuga a 40.000 x g durante 30 min a 4°C. La capa de grasa se separa con una espátula; el líquido restante se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga y se centrifuga de nuevo a 40.000 x g durante 30 min.

5 La capa líquida (suero de leche) se prepara en partes alícuotas y se almacena a -20°C o se usa para el cribado directamente.

Muestra de control positivo

Como muestra positiva, se prepara leche humana como se ha descrito antes.

Muestras de control negativo

10 Como control negativo para la leche de vaca se usa (Vollmilch, 3,5% de grasa, Niederösterreichische Molkerei, Austria).

Se usa el control negativo para la leche de cabra "Ja Natürlich" Ziegenmilch, Sennerei Zillertal, Austria.

Cribado por ELISA

15 El cribado se lleva a cabo en un formato ELISA estándar: para el cribado de muestras de leche de cabra, las placas de ELISA (Nunc Maxi-Sorp Immuno Plate) se recubren con anticuerpo de conejo anti-IgA de cabra policlonal (AbD Serotec nº AAI44) en una concentración de 1 microgramo por ml de tampón de recubrimiento (3,03 g de Na₂CO₃, 6,0 g de NaHCO₃ en 1000 ml de agua destilada, pH 9,6), con 100 microlitros por pocillo. Para el cribado de muestras de leche bovina o muestras de leche de oveja, se recubren las placas con anticuerpo anti-IgA bovina (Genataur nº RA-10A, Bélgica) o anti-IgA de oveja (LSBio nº LS-C57110, EE.UU.), respectivamente. Para las muestras de control positivo, se recubren con anticuerpos anti-IgA humana los respectivos pocillos (Bethyl Laboratories nº A80-103A, EE.UU.). Las placas se cierran con una tapa y se incuban durante la noche a 4°C.

20 Antes de la siguiente etapa, se retira la solución de recubrimiento y las placas se lavan tres veces llenando los pocillos con 200 µl de TPBS (1,16 g de Na₂HPO₄, 0,1 g de KCl, 0,1 g de K₃PO₄, 4,0 g de NaCl en 500 ml de agua destilada, Tween20 al 0,05% (v/v), pH 7,4). Las soluciones o lavados se eliminan sacudiendo la placa sobre un fregadero. Las gotas restantes se eliminan golpeando ligeramente la placa sobre una toalla de papel. Alternativamente, el lavado se puede realizar con un lavador de ELISA.

25 Las placas se llenan con tampón de bloqueo Superblock (Thermo nº 37515) 150 microlitros/pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

De nuevo, las placas se lavan como se ha descrito antes.

30 Las muestras de suero de leche se diluyen en TPBS de muestra (1:2 y 1:10). Se añaden 16 controles negativos para cada dilución (1:2 y 1:10) a cada placa. Se añaden 4 muestras de control positivo para cada dilución a la placa. Se añaden 100 microlitros de las diluciones respectivas a los pocillos de la placa lavada y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

35 Después del lavado, se añaden 100 microlitros de una mezcla de diluciones de anticuerpo anti-Lewis x (LSBio nº LS-C75829), anticuerpo anti-sialil-Lewis a (LSBio nº LS-C33820), anticuerpo anti-Lewis a (LSBio nº LS-C50512), anticuerpo anti-sialil-Lewis b (GeneTex nº GTX72378, EE.UU. 1:300), anticuerpo anti-Lewis b (LSBio nº LS-C46049) y anticuerpo anti-Lewis y (LSBio nº LS-C71674, EE.UU., 1:50) en TPBS a los respectivos pocillos de muestra y a los pocillos de muestra de control negativo y positivo.

La placa se incuba de nuevo durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lava.

40 Después, se añaden 100 microlitros por pocillo de un anticuerpo de pollo anti-IgG de ratón-HRP (Thermo, nº SA1-72029, 1:500 en TPBS) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavan tres veces con TPBS.

45 Después, se lleva a cabo una etapa de lavado adicional con tampón de sustrato (kit de sustrato TMB, Vector Laboratories nº SK-4400, EE.UU.). A continuación, se añade sustrato cromogénico (Vector Laboratories SK-4400). Después de una incubación corta (medición del control positivo a DO 650 > 1,0, DO de control negativo <0,2) se añaden 50 microlitros de ácido sulfúrico 1 N y la placa se lee en el lector de microplacas a DO450, compensado por DO600 como en técnicas ELSA estándar usando TMB como sustrato.

Evaluación:

Los valores de DO de los 16 controles negativos para cada dilución se usan para calcular la media y la desviación estándar de las señales negativas.

Una muestra de suero de leche se considera positiva en este ensayo de cribado si muestra, con al menos una dilución, una absorbancia mayor que la absorbancia media más 2 veces la desviación estándar de los controles negativos a la misma dilución.

Las muestras positivas de suero de leche se usan para análisis adicionales.

- 5 El ejemplo demuestra que se pueden seleccionar y cribar especies animales, individuos y razas con el fin de producir leche con un contenido sustancialmente mayor de SIgA con glicosilación de Lewis que la leche actualmente disponible en el mercado.

Ejemplo 2

Expresión del componente secretor humano recombinante con fucosilación de Lewis en células de mamífero

- 10 Este ejemplo describe el establecimiento de células de mamífero que expresan el componente secretor modificado por diferentes glicosiltransferasas y el posterior cribado de clones que producen el componente secretor con fucosilación de Lewis.

La secuencia de proteína del componente secretor (la parte extracelular de plgR) se muestra en la figura 1.

- 15 La secuencia de proteína se traduce de forma inversa en ADN (optimizado para la expresión en células de mamífero) y se sintetiza de nuevo (Geneart, Alemania). Para fines de clonación, el ADN se proporciona con sitios de reconocimiento y escisión HindIII y XbaI (en cursiva y subrayado). Véase la figura 2.

El gen se inserta en los sitios HindIII y XbaI en el vector pCDNA3.1+ (Invitrogen, EE.UU.).

- 20 Para generar transfectantes estables, los plásmidos se linealizan con PvuI y posteriormente se transfectan en células CHO-K1 (CHO DUK-; ATCC CRL 9096) usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con el fabricante (Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección, las células en cada matraz T se dividen en cinco placas de Petri de 100 mm y se incuban en el medio de selección. La concentración de G418 es 200-400 microgramos/ml. El medio de selección se cambia cada tres días. Los clones resistentes a fármacos se pueden ver después de aproximadamente 2 semanas, se identifican bajo el microscopio y se seleccionan a mano usando Pipetman. Las colonias seleccionadas se cultivan en placas de 96 pocillos en presencia de G418 durante 2 semanas. Las células en crecimiento se dividen en pocillos duplicados y se analiza en los líquidos sobrenadantes la expresión del componente secretor en un ELISA estándar. En resumen, se recubren las placas con el anticuerpo anti-componente secretor de cabra (Acris Antibodies AP21476FC-N), después de incubación y lavado, se añaden los líquidos sobrenadantes de las células (diluidos 1:2 y 1:10). Después de incubación y lavado, se añade anticuerpo de ratón anti-SC humano (Sigma I6635) y posteriormente se detecta con anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP. Los clones positivos seleccionados se usan para la purificación del componente secretor y para la posterior transfección con glicosiltransferasas.
- 25
- 30

Transfección con diferentes glicosiltransferasas: Se seleccionan clones positivos estables que expresan el componente secretor y se transfectan con 2 plásmidos, uno que codifica fucosiltransferasa 2 y fucosiltransferasa 3, y el otro una beta 1,3-galactosiltransferasa.

- 35 La secuencia de proteína de la alfa 1,2-fucosiltransferasa (FUT2) se muestra en la Figura 3.

Se hace la traducción de nuevo de la secuencia de FUT2 que incluye sitios de reconocimiento y escisión de NheI y EcoRI en los extremos 5' y 3'. El gen se sintetiza de nuevo (Geneart, Alemania), véase la Figura 4. El gen se clona con NheI y EcoRI en el sitio de clonación múltiple A del vector pIRES (Clontech, nº 631605), dando como resultado pIRESF2.

- 40 La secuencia de proteína de la fucosiltransferasa 3 se muestra en la figura 5.

La secuencia se traduce de nuevo en una secuencia optimizada de uso de codones y se proporciona con los sitios de reconocimiento XbaI y NotI al final del todo, véase la figura 6.

El ADN se sintetiza de nuevo y se clona en los sitios XbaI y NotI del sitio de clonación múltiple B del vector pIRESF2 que contiene el gen de FUT2 como se ha descrito antes, dando como resultado el plásmido pIRESF23.

- 45 Para la transfección, el vector pIRESF23 que contiene los genes FUT2 y FUT3 se linealiza con BpmI.

- Se prepara una serie de plásmidos de expresión que contienen diferentes beta-1,3-galactosil-transferasas. Por lo tanto, las secuencias de proteínas para las galactosil-transferasas se traducen nuevamente en secuencias de ADN (optimizadas para la expresión en células de mamífero) y se proporcionan sitios de restricción únicos en los extremos (NheI y NotI). El ADN se sintetiza y clona en el sitio NheI y NotI de pEF1alphaIRES (Clontech631970). El respectivo plásmido se linealiza con AatII antes de la cotransfección con pIRESF23 que contiene FUT2 y FUT3 en células CHO que expresan el componente secretor humano recombinante.
- 50

ES 2 691 619 T3

La secuencia de proteína de la beta 1,3-galactosiltransferasa I se muestra en la figura 7.

El gen de la beta 1,3-galactosiltransferasa I se muestra en la Figura 8

La secuencia de proteína de la beta 1,3-galactosiltransferasa V se muestra en la figura 9, el respectivo gen listo para la clonación se muestra en la figura 10.

- 5 La secuencia de proteína de la beta 1,3-galactosiltransferasa II se muestra en la figura 11, el respectivo gen con sitios de clonación se muestra en la figura 12.

Procedimiento de transfección y selección

- 10 Los clones de células CHO que expresan el componente secretor humano se están transfectando en un procedimiento de transfección convencional con mezclas de plásmidos: pIRESF23 linealizado se combina con plásmidos linealizados que codifican beta-1,3-galactosiltransferasa I, beta-1,3-galactosiltransferasa II y beta-1,3-galactosiltransferasa V, respectivamente. A la transfección le sigue un procedimiento de selección convencional para producir clones estables (la concentración de G418 se puede aumentar a 1000 microgramos por ml de medio de selección).

Cribado de clones que expresan el componente secretor con glicosilación de Lewis:

- 15 Los líquidos sobrenadantes de los clones de CHO se ensayan en ELISA específico para el componente secretor y la glicosilación de Lewis:

- 20 El cribado se lleva a cabo en un formato ELISA estándar: para el cribado de los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares, las placas ELISA (Nunc Maxi-Sorp Immuno Plate) se recubren con anticuerpos anti-componente secretor humano (Ray Biotech nº DS-PB-03010, EE.UU.) en una concentración de 1 microgramo por ml de tampón de recubrimiento (3,03 g de Na₂CO₃, 6,0 g de NaHCO₃ en 1000 ml de agua destilada, pH 9,6), con 100 microlitros por pocillo.

Las placas se cierran con una tapa y se incuban durante la noche a 4°C.

- 25 Antes de la siguiente etapa, se retira la solución de recubrimiento y las placas se lavan tres veces llenando los pocillos con 200 µl de TPBS (1,16 g de Na₂HPO₄, 0,1 g de KCl, 0,1 g de K₃PO₄, 4,0 g de NaCl en 500 ml de agua destilada, Tween20 al 0,05% (v/v), pH 7,4). Las soluciones o lavados se eliminan sacudiendo la placa sobre un fregadero. Las gotas restantes se eliminan golpeando ligeramente la placa sobre una toalla de papel. Alternativamente, el lavado se puede realizar con un lavador de ELISA.

Las placas se llenan con tampón de bloqueo Superblock (Thermo nº 37515) 150 microlitros/pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 30 De nuevo, las placas se lavan como se ha descrito antes.

Los líquidos sobrenadantes del cultivo celular se diluyen en TPBS de muestra (1:2 y 1:10). Se añaden 16 controles negativos para cada dilución (1:2 y 1:10) a cada placa. Se añaden 4 muestras de control positivo para cada dilución a la placa. Se añaden 100 microlitros de las diluciones respectivas a los pocillos de la placa lavada y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

- 35 Después del lavado, se añaden 100 microlitros de una mezcla de diluciones de anticuerpo anti-Lewis x (LSBio nº LS-C75829), anticuerpo anti-sialil-Lewis a (LSBio nº LS-C33820), anticuerpo anti-Lewis a (LSBio nº LS-C50512), anticuerpo anti-sialil-Lewis b (GeneTex nº GTX72378, EE.UU. 1:300), anticuerpo anti-Lewis b (LSBio nº LS-C46049) y anticuerpo anti-Lewis y (LSBio nº LS-C71674, EE.UU., 1:50) en TPBS a los respectivos pocillos de muestra y a los pocillos de muestra de control negativo y positivo.

- 40 La placa se incuba de nuevo durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lava.

Después, se añaden 100 microlitros por pocillo de un anticuerpo de pollo anti-IgG de ratón-HRP (Thermo, nº SA1-72029, 1:500 en TPBS) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavan tres veces con TPBS.

- 45 Después, se lleva a cabo una etapa de lavado adicional con tampón de sustrato (kit de sustrato TMB, Vector Laboratories nº SK-4400, EE.UU.). A continuación, se añade sustrato cromogénico (Vector Laboratories SK-4400). Después de una incubación corta (medición del control positivo a DO 650 > 1,0, DO de control negativo <0,2) se añaden 50 microlitros de ácido sulfúrico 1 N y la placa se lee en el lector de microplacas a DO450, compensado por DO600 como en técnicas ELSA estándar usando TMB como sustrato.

Evaluación:

Los 16 controles negativos para cada dilución se usan para calcular la media y la desviación estándar de las señales negativas.

5 Una muestra se considera positiva en este ensayo de cribado si muestra, con al menos una dilución, una absorbancia mayor que la absorbancia media más 2 veces la desviación estándar de los controles negativos a la misma dilución.

Las muestras positivas se usan para la purificación de proteínas y análisis posteriores.

Este ejemplo demuestra que es posible generar componente secretor que no deriva de la leche humana con una elevada proporción molar de epítomos de Lewis.

Ejemplo 3:

10 Evaluación cuantitativa de la presencia de epítomos de Lewis en el componente secretor

La purificación del componente secretor recombinante del líquido sobrenadante de células animales y la IgA secretora se realiza mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo de conejo anti-componente secretor humano acoplado con Sepharose de acuerdo con protocolos convencionales.

Preparación de muestras para análisis de glicanos:

15 La IgA secretora purificada se separa en SC, cadena J, cadena H y cadena ligera mediante la SDS-PAGE reductora (80x80x1 mm, 10% de gel BisTris NuPAGE, tampón de ejecución MES SDS (Invitrogen)). Las bandas de proteína se visualizan mediante tinción con Coomassie. Se usan patrones de masa molecular.

Las bandas teñidas con Coomassie de ~80 kDa se escinden y se digieren en el gel con tripsina y se alquilan (kit de digestión triptica en gel, Thermo Scientific producto nº 89871).

20 Los péptidos purificados, reducidos y alquilados del componente secretor se defucosilan en el resto de GlcNAc más interno mediante tratamiento durante una noche en NH₄Ac 10 mM (pH 5,0) a 37°C con alfa-1-6-fucosidasa de riñón bovino (ProZyme, nº GKX- 5006, EE.UU.). La eliminación completa de fucosas centrales se puede verificar, si es necesario, mediante el análisis de los N-glicanos liberados por cromatografía sobre carbono grafito poroso con detección de MS.

25 El análisis de péptidos y glicopéptidos se lleva a cabo en un sistema capilar LC-ESI-MS que consiste en una precolumna Aquasil C-18 (30 mm x 0,32 mm, 5 micrómetros, Thermo Scientific), una columna analítica BioBasic C18 (150 mm x 0,18 mm, 5 micrómetros, Thermo Scientific), un Waters CapLC, una válvula Rheodyne de 10 puertos y un Waters Q-TOF Ultima con fuente estándar de ESI.

30 El disolvente A consiste en formiato de amonio 65 mM de pH 3,0 y el disolvente B es acetonitrilo al 80% (ACN) en el disolvente A. La precolumna se equilibra y se carga en ausencia de ACN. Después, se desarrolla un gradiente de 6,3 a 62,5% de disolvente B a lo largo de 45 minutos. Se miden los iones positivos en el intervalo de m/z 150 a 1800. La tensión capilar es de 3,2 kV y la tensión de cono de 35 V, la temperatura de la fuente es 100°C, la temperatura de desolvatación es 120°C.

35 Los datos se evalúan usando el software MassLynx 4.0, que incluye la función de deconvolución/desisotopado MaxEnt3 (Waters).

Los péptidos glicosilados se identifican por desglicosilación con PNGnasa F (Roche) y posterior separación en HPLC de fase inversa seguido de espectroscopía de masas. El péptido desglicosilado contiene un ácido glutámico en lugar de un resto de glutamina, que da como resultado una diferencia de masa de 1 Da.

40 Diferentes estructuras de glicanos en la misma cadena principal peptídica dividen la posible señal de glicopéptidos en varias especies moleculares de diferente masa. La presencia de glicopéptidos también se puede indicar en un espectro de masa total como una escalera de masas con pasos basados en diferencias específicas de monosacáridos (p. ej., m/z 146 [Fucosa], 162 [Hexosa], 203 [N-acetilhexosamina], 291 ácido N-acetil-neuramínico) entre las diferentes glicoformas.

45 Una vez que se identifican los picos de glicopéptidos, se mide el "volumen" de picos, es decir, el área bajo los picos correspondientes a un glicopéptido particular. El volumen del pico se puede traducir directamente en proporciones molares de glicoformas ya que la ionización y, por lo tanto, la detección de los glicopéptidos está dominada por la parte del péptido.

Los espectros de masas se adquieren durante el tiempo de elución de un glicopéptido identificado o potencial y se suman, suavizan y se centran antes de enviar el espectro m/z frente a intensidad al software para su análisis.

50 Para aumentar la relación señal/ruido para glicoformas de baja intensidad, se recomienda sumar los espectros de MS solo en el pico de elución respectivo en lugar de a lo largo de un marco de tiempo cromatográfico más amplio.

ES 2 691 619 T3

De la lista de glicofomas que se producen en un sitio de glicosilación particular, se calcula la fracción molar de glicanos fucosilados. Los resultados para los diferentes sitios se añaden para llegar a la proporción molar de glicanos fucosilados que se producen en el componente secretor.

Los resultados ilustrativos y los cálculos se muestran con una muestra de componente secretor humano:

5 Cantidad relativa de cada glicofoma del péptido:

Péptido 82-109

2,6% de Hex₉HexNAC₇Fuc₃NeuAc₀

5,2% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₀NeuAc₀

15,6% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₂NeuAc₀

10 4,2% de Hex₁₀HexNAC₇Fuc₄NeuAc₀

21,8% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₃NeuAc₀

21,3% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₄NeuAc₀

15,9% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₃NeuAc₁

8,1% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₄NeuAc₁

15 3,3% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₅NeuAc₁

2,0% de Hex₁₀HexNAC₈Fuc₄NeuAc₂

En los sitios de glicosilación Asn83 y Asn90, el 95% de las glicofomas llevan restos de fucosa no centrales

péptido 168-190

3,3% de Hex₅HexNAC₄Fuc₀NeuAc₀

20 55, 1% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₀

35,4% de Hex₅HexNAC₄Fuc₃NeuAc₀

6,1% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₁

En los sitios de glicosilación Asn186 97% de las glicofomas llevan restos de fucosa no centrales

péptido 413-434

25 24,2% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₀

37,7% de Hex₅HexNAC₄Fuc₃NeuAc₀

38,2% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₁

En los sitios de glicosilación Asn421, el 100% de las glicofomas llevan restos de fucosa no centrales

péptido 457-479

30 11,0% de Hex₅HexNAC₄Fuc₀NeuAc₀

46,9% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₀

42,1% de Hex₅HexNAC₄Fuc₃NeuAc₀

En el sitio de glicosilación Asn469, el 89% de las glicofomas llevan restos de fucosa no centrales.

péptido 498-515

35 6,1% de Hex₄HexNAC₃Fuc₀NeuAc₀

7,7% de Hex₅HexNAC₃Fuc₀NeuAc₀

3,6% de Hex₅HexNAC₄Fuc₀NeuAc₀

18,9% de Hex₆HexNAC₃Fuc₀NeuAc₀

23,2% de Hex₅HexNAC₄Fuc₁NeuAc₀

7,8% de Hex₆HexNAC₃Fuc₂NeuAc₀

25,8% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₀

5 5,1% de Hex₅HexNAC₄Fuc₃NeuAc₀

1,8% de Hex₅HexNAC₄Fuc₂NeuAc₁

En el sitio de glicosilación Asn499, el 64% de las glicoformas contienen restos de fucosa no centrales.

Fucosilación no central (Lewis) de la muestra = 0,95 mol + 0,97 mol + 1 mol + 0,89 mol + 0,64 mol = 4,45 mol/mol de componente secretor

10 Ejemplo 4

Expresión de IgA dimérica en células de mamífero y reconstitución de una molécula de SIgA con componente secretor con glicosilación de Lewis recombinante

15 Se usan células murinas J558L como hospedantes para la expresión de un anticuerpo de la línea germinal que se une al hapteno nitrofenilo. Para este fin, la cadena pesada quimérica (VH murino/región constante de IgA2 humana) se clona en el vector de expresión de mamífero pCDNA3.1, el plásmido se transfecta en células J558L y se seleccionan y criban clones que expresan de forma estable dIgA. En paralelo a la cadena pesada de IgA2, se prepara y usa una construcción con cadena pesada de IgA1.

La IgA dimérica se purifica y se reconstituye con el componente secretor recombinante de las células CHO (véase el ejemplo 2).

20 La secuencia de proteína de anticuerpo anti-cadena pesada de IgA-nitrofenilo quimérico (letras minúsculas = péptido líder, subrayado = VH murino) se muestra en la figura 13, la secuencia de ADN de la construcción de cadena pesada, que incluye los sitios de restricción HindIII y XbaI se muestra en la figura 14.

25 El gen se sintetiza completamente con los sitios HindIII y XbaI (Geneart, Alemania) y se clona en los sitios respectivos en pCDNA3.1 + (Invitrogen, EE.UU.). Antes de la transfección, el plásmido recombinante se linealiza con PvuI.

30 Células murinas J558L (colecciones de cultivo de la Agencia de Protección de la Salud nº 88032902), que muestran síntesis constitutiva de la cadena J y una cadena ligera lambda específica para NIP, se cultivan en medio RPMI con penicilina (100 IU/ml) y estreptomycin (100 microg/ml; Bio Whittaker, Walkersville, MD) y 10% de suero de ternero fetal (Invitrogen) a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. La transfección estable de J558L se consigue mediante electroporación, y los clones se seleccionan en medio que contiene 500 microg/ml de G418 (Sigma). Las células se incuban durante 2-3 semanas antes de recoger los líquidos sobrenadantes y se criban según la producción de inmunoglobulina mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

35 Para ELISA, las microplacas se recubren con anticuerpo anti-cadena j (anti-cadena J de cabra, Santa Cruz, sc-34654). Después del lavado, se añaden los líquidos sobrenadantes del cultivo celular (diluidos 1:2 y 1:10). Posteriormente a la incubación y el lavado, se usa un conjugado de anticuerpo anti-cadena alfa de IgA humana-HRP para la detección de líneas celulares que expresan IgA.

La purificación de dIgA recombinante del líquido sobrenadante de cultivo de clones seleccionados se lleva a cabo por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo anti-IgA humana acoplada con sepharose (Sigma A2691) de acuerdo con el fabricante y procedimientos de cromatografía de afinidad estándar.

40 Reconstitución de SIgA a partir de IgA y componente secretor recombinante

La reconstitución de los complejos de dIgA-componente secretor se llevó a cabo in vitro mezclando de forma equimolar dIgA purificado y el componente secretor purificado (fucosilado y no fucosilado respectivamente) durante la noche en tampón PBS en una concentración de 10 microgramos por 100 microlitros.

45 Los complejos reconstituidos se cargan en un gel de SDS-poliacrilamida al 6% no reductor y reductor, respectivamente, se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilidino y se detectan con antisuero contra el componente secretor.

50 La reconstitución covalente tiene lugar según lo indicado por el cambio del componente secretor a la posición de las moléculas de dIgA y pIgA. En condiciones reductoras, solo se puede detectar el componente secretor libre en una extensión similar en cada banda, lo que indica que el componente secretor y la IgA están unidos por puentes disulfuro.

Los complejos se purifican más por HPLC. Dicha SIgA purificada (glicosilación de Lewis y no fucosilado) en PBS se cuantifica y se usa en experimentos de estabilidad y unión al antígeno.

Ejemplo 5:

Ensayo de estabilidad de SIgA con glicosilación de Lewis recombinante

- 5 Los diversos ensayos se llevan a cabo para mostrar la estabilidad biofísica, bioquímica y biológica de las moléculas descritas en la presente memoria.

Para la estabilidad biofísica, las muestras se analizan por calorimetría diferencial de barrido:

- 10 Los inmunocomplejos y anticuerpos se dializan frente a un tampón de citrato sódico 20 mM, NaCl 150 mM a pH 6,0. Las concentraciones de anticuerpos se miden por absorbancia UV. Los anticuerpos se diluyen a 1 mg/ml usando dializado. Los barridos se llevan a cabo usando un DSC capilar automático (MicroCal, LLC). Se llevan a cabo dos barridos con dializados para la resta del valor base. Los barridos se realizan de 20-95°C a 1°C/min usando el modo de retroalimentación de medio. Los barridos se analizan usando Origin 7.0. Los valores base distintos de cero se corrigen usando un polinomio de tercer orden. Las transiciones de desplegamiento de cada inmunocomplejo se ajustan usando el modelo de desplegamiento que no es de dos estados dentro del software.

- 15 Estabilidad bioquímica (electroforesis en gel después de incubación con ácido): Se hace intercambio de tampón de todas las muestras con inmunocomplejos y controles en las formulaciones de diferentes valores de pH (4,0, 5,0, 6,0 y 7,0) usando una columna desaladora (columna NAP25, GE Healthcare) y sus concentraciones se ajustan a 5 mg/ml. Las soluciones de anticuerpos formuladas se esterilizan mediante filtro de 0,22 micrómetros y se carga 1 ml de cada solución en un vial de vidrio de 5 ml de capacidad, USP de tipo I, esterilizado y se sella con un tapón de caucho tratado en autoclave. Estas muestras preparadas se almacenan en el incubador a temperatura controlada a 40°C durante 1 día antes del análisis de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).

- 20 Cromatografía de exclusión por tamaño molecular: Mediante la SEC se analiza la cantidad de agregados (productos de alto peso molecular) y especies de degradación (productos de bajo peso molecular) usando una columna G3000SWXL (7,8 mm d.i., 30 cm; Tosoh Corp. Japón). La fase móvil consiste en fosfato sódico 50 mM (pH 7,0) y cloruro sódico 500 mM. Las condiciones experimentales son las siguientes: proteína inyectada, 20 mg; caudal, 0,5 ml/min; longitud de onda de detección, 215 y 280 nm; y tiempo de análisis, 30 min. Las cantidades de productos de alto peso molecular y productos de bajo peso molecular presentes en las muestras que se han almacenado a 40°C durante 1 día en viales de vidrio se determinan y expresan como un aumento relativo en comparación con las respectivas muestras recién preparadas.

- 30 Estabilidad de proteasa

- Todas las digestiones se llevan a cabo a 37°C durante 8 h con concentraciones de proteínas de las muestras de 5 mg/ml y volúmenes totales de 1 ml. Se usan tripsina y pepsina (Sigma, EE.UU.) como enzimas proteolíticas. Las digestiones con tripsina se llevan a cabo en tampón Tris 0,05 M, pH 8,0. Las digestiones con pepsina se llevan a cabo en tampón de acetato sódico 0,05, pH 4,0. Todas las proteínas se dializan durante 24 horas contra estos tampones antes de digestión. Las relaciones de enzima a proteína son 1:25 o 1:50 para ambas enzimas. Las digestiones con tripsina se detienen por adición de una cantidad equimolar de inhibidor de tripsina de soja (Sigma) a la mezcla de reacción, mientras que las digestiones con pepsina se terminan elevando el pH de la solución a aproximadamente 8 por adición de 100 microlitros de Tris 2,5 M. Después de las digestiones, todas las mezclas de reacción se congelan antes de análisis adicionales.

- 40 Evaluación de la digestión: cada digestión se descongela y se aplica a una columna (1,5 x 90 cm) de Superdex 200 (GE Healthcare), calibrada con dímero de IgA, IgG y albúmina de suero bovino. La absorbancia del eluato se registra a 280 nm.

El área bajo el pico para los picos que aparecen y en la posición correspondiente a las moléculas intactas se expresa como porcentaje del área total.

- 45 Ejemplo 6:

Ensayo de especificidad de SIgA glicosilada de manera diferente

Se puede ensayar la unión de diferentes SIgA positivos para Lewis y negativos para Lewis (SIgA reconstituida como se describe en el ejemplo anterior) a un espectro de estructuras de patógenos.

- 50 Los títulos de inmunocomplejos purificados descritos en la presente memoria se pueden ensayar en un procedimiento ELISA para la unión a lipopolisacárido (LPS) derivado de *Escherichia coli*, ácido lipoteicoico derivado de *Staphylococcus aureus* (L2515, Sigma, EE.UU.), peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (PGN) y hemocianina de lapa californiana (KLH, MP Biomedicals). El ensayo se describe en *J. Dairy Sci.* vol. 93 pág. 5467-5473:

5 Las placas se recubren con 100 µl/pocillo de 1 µg de KLH, 4 µg de LPS, 5 µg de LTA o 2 µg de PGN por ml de tampón de carbonato (10,6 g/l de Na₂CO₃, pH 9,6). Después del lavado, las placas se bloquean con 100 µl/pocillo de suero de conejo al 2,5% en PBS con Tween20 al 0,05% durante al menos 30 min a temperatura ambiente (21°C). Se añaden diluciones seriadas de muestras (1:4) en PBS, Tween20 al 0,05% y suero de conejo al 2,5%. Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente (21°C).

10 La unión de inmunocomplejos y anticuerpos a LPS, LTA, PGN o KLH se detecta usando 100 µl/pocillo de anticuerpo de conejo anti-IgA bovina-(anti-humana, anti-cabra) acoplado a peroxidasa diluido a 1:15.000. Después del lavado, se añaden 100 µl/pocillo de tetrametilbencidina (71,7 µg/ml) y H₂O₂ al 0,05% a los pocillos y se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente (21°C). La reacción se detiene con 50 µl/pocillo de H₂SO₃ 2,5 N. Las extinciones se miden con un espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda de 450 nm. Los niveles se calculan como títulos, y los títulos se expresaron como valores log₂ de las diluciones que dan una extinción más cercana al 50% de Emáx, donde Emáx representa la extinción media más alta de una muestra positiva de referencia presente por duplicado en cada placa de microtitulación.

15 La unión a la toxina A de *Clostridium difficile* e intimina de *E. coli* se ha descrito, p. ej., en *The Journal of Biological Chemistry* VOL. 281, NO. 20, pág. 14280-14287, la unión a VLP de norovirus se describe, p. ej. en *Journal of Virology*, vol. 79, pág. 6714-6722:

20 Ensayo de unión de micropocillos: los pocillos de placas Nunc MaxiSorp ELISA se recubren con 200 ng de inmunocomplejo, anticuerpos o componente secretor en 100 microlitros de bicarbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se bloquean con 200 microlitros de PBS-T que contiene 5% (p/v) de leche descremada en polvo. La toxina A (500 ng/ml) o GST-intimina (200 ng/ml) o VLP de norovirus (1 microgramo/ml) en 100 microlitros de PBS se incuban durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS-T, la unión se detecta usando anticuerpos específicos (la interacción SC-toxina A se detecta con IgG murina anti-toxina A, las VLP de norovirus se detectan con anticuerpo de ratón anti-norovirus y GST-intimina se detecta usando mAb murino contra GST), seguido de IgG de cabra anti-ratón, conjugado con peroxidasa de rábano picante y 1,2-fenilendiamina como cromógeno. Las reacciones se detienen con un volumen de H₂SO₄ 2 M y la densidad óptica se mide a 492 nm usando 620 nm como longitud de onda de referencia.

Ejemplo 7:

Actividad antibacteriana de SIgA de cabra obtenida de acuerdo con el ejemplo 11 - Unión de anticuerpos naturales a antígenos bacterianos

30 La reactividad de inmunocomplejos purificados descritos en la presente memoria con lipopolisacárido (LPS) derivado de *Escherichia coli* y toxina A de *Clostridium difficile* se ensaya en ELISA.

35 Las placas se recubren con 100 µl/pocillo de 4 µg de LPS (Lipopolisacárido de *E. coli* O157H7, List Biological Laboratories, Campbell, CA, EE.UU., Cat. n° 206) o 1 µg de *Clostridium difficile* Toxina A (List Biological Laboratories, Campbell, CA, EE.UU., Cat. n° 152) por ml de tampón de carbonato (Na₂CO₃ 10,6 g/l, pH 9,6). Después del lavado, las placas se bloquean con 100 µl/pocillo de suero de conejo al 2,5% en PBS con Tween20 al 0,05% durante al menos 30 min a temperatura ambiente (21°C). Se añaden diluciones seriadas de muestras (1:4) en PBS, Tween20 al 0,05% y suero de conejo al 2,5%. Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente (21°C).

40 La unión de inmunocomplejos y anticuerpos a LPS o toxina A de *C. diff.* se detecta usando 100 µl/pocillo de anticuerpo de conejo anti-IgA de cabra (y anti-IgA humana respectivamente) acoplado con fosfatasa alcalina diluido 1:15.000. Después de lavado, se añaden 100 µl/pocillo de paranitrofenilfosfato a los pocillos y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente (21°C).

La densidad óptica se mide con un espectrofotómetro de microplaca a una longitud de onda de 405 nm.

45 Las preparaciones ensayadas eran SIgA humana (Sigma I2636) y varias SIgA de cabra preparadas a partir de diferentes muestras de acuerdo con el ejemplo 11 más adelante, todas con al menos 0,01 mol de fucosas no centrales por mol de SIgA. Como resultado, todos las SIgA de cabra se unían a la toxina A de *C. diff.* y a LPS (*E. coli* O157H7) aproximadamente cinco veces más que la referencia humana.

Ejemplo 8:

Ensayo de cribado rápido para determinar inmunocomplejos fucosilados no centrales en muestras de leche o suero de leche mediante un ensayo de flujo lateral

50 Se puede usar un ensayo simple y rápido para decidir sobre la inclusión de una determinada muestra de leche en la mezcla con el fin de aumentar el nivel de N-glicosilación con epítopos de Lewis en el componente secretor de la mezcla.

Dicho ensayo in situ puede ser un inmunoensayo rápido que se optimiza para mostrar positividad en un determinado umbral con muestras de leche o suero de leche.

- Los ensayos de flujo lateral (ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral) son un dispositivo sencillo destinado a detectar la presencia de un analito objetivo en una muestra. A menudo producidos en un formato de tira reactiva, los ensayos de flujo lateral son una forma de inmunoensayo en el que la muestra de ensayo fluye a lo largo de un sustrato sólido por acción capilar. Después de aplicar la muestra al ensayo, se encuentra con un reactivo coloreado que se mezcla con la muestra y transporta el sustrato encontrando líneas o zonas que han sido inmovilizadas por proteínas de unión. Dependiendo de los analitos presentes en la muestra, el reactivo coloreado puede unirse a la línea o zona de ensayo. Un esquema de dicho ensayo se muestra en la Fig. 15.
- Se puede llevar a cabo un inmunoensayo de flujo lateral en 15 min y se puede usar para seleccionar muestras de leche o suero que contienen inmunocomplejos con mayor fucosilación no central.
- Las especificaciones para el ensayo son la detección de un componente secretor glicosilado no central en la matriz de leche o suero de leche, a un determinado umbral de glicosilación (expresado en mol de fucosa no central por mol de componente secretor). Para la optimización de dicho ensayo, se usa SIgA purificada sin, con baja y con alta fucosilación no central (según se determina mediante glicanálisis, véase por ejemplo el ejemplo 9).
- Dichos ensayos con determinadas especificaciones se pueden desarrollar con empresas contratantes como Kestrel Biosciences (Carlsbad, EE.UU.), Biocare Diagnostics (Xiangzhou, China), Biotem (Francia) y otras.
- Alternativamente, el ensayo se diseña usando un dispositivo de ensayo rápido genérico (gRAD, RapidAssays, Copenhague, Dinamarca). Básicamente, un reactivo de captura biotinilado, un reactivo de detección marcado con oro y la muestra se mezclan y después se aplican a un dispositivo de ensayo de flujo lateral. El dispositivo de gRAD utilizado en este ejemplo contiene una zona de anticuerpo anti-IgG de conejo inmovilizada y una zona de unión a biotina (control).
- El reactivo de captura en este ejemplo es proteína de fusión DC-SIGN-Fc biotinilada.
- El anticuerpo de detección marcado con oro en este ejemplo es un conejo anti-IgA de cabra.
- Los reactivos de detección y captura se producen de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por RapidAssays, Dinamarca. El ensayo es el optimizado de acuerdo con las instrucciones de los kits de reactivos RapidAssays.
- Biotinilación:
- Se mezcla DC-SIGN-Fc (R&D Systems, n.º 161-DC-050) primero con reactivo de biotinilación que reacciona con la amina primaria libre presente en la proteína. Después el reactivo de biotina no acoplado a proteína se separa por cromatografía. Para usar con el gRAD, el conector debe ser tan largo como sea posible. EZ-conector NHS-PEG12-Biotina, Biotina-NHS, Biotina-LC-NHS y Biotina-PEG4-NHS (Pierce) deben probarse y compararse en la fase de optimización del ensayo.
- Se usan PBS a pH 7,4 y tampón de carbonato 100 mM a pH 8,0, respectivamente, para la biotinilación de DC-SIGN-Fc (no debe estar en tampón Tris o contener azida sódica, ya que eso bloqueará la conjugación). La concentración de DC-SIGN-Fc debe ser 1 mg/ml.
- Se añaden 2 µl de solución madre de biotinilación (Concentraciones de madre en mg/ml en DMSO: Biotina-NHS (40), Biotina-LC-NHS (53), Biotina-PEG4-NHS (69), Biotina-PEG12-NHS (110)) por mg de DC-SIGN-Fc.
- La mezcla de reacción después se mezcla a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2 horas. La biotina-NHS activa restante se bloquea con la adición de 10 µl de etanolamina 3 M y se incuba durante otros 30 minutos.
- Se usa la filtración en gel/intercambio de tampón con medio Sphadex G25 para separar la biotina libre. Para volúmenes más pequeños, la filtración en gel se puede llevar a cabo con pequeñas columnas desechables, por ejemplo, una PD10 (General Electric). El procedimiento se repite para separar la mayor cantidad posible de biotina libre, ya que competirá por la unión a la línea de ensayo reduciendo la respuesta resultante.
- Preparación del reactivo de detección recubierto de oro coloidal (según las instrucciones de RapidAssays):
- Se usa anticuerpo de conejo anti-IgA de cabra policlonal (Acris Antibodies GmbH, Alemania, N° AP05548PU-N) y se prepara para que esté en una concentración de 1 mg/ml o mayor y debe estar en una solución tampón de PBS de 0,5 X.
- Se usan sol Naked Gold 40 nm y sol Naked Gold 20 nm.
1. Agitar o remover el oro para volver a suspender el oro depositado. Poner 0,5 ml de sol Naked Gold en diez (10) tubos de ensayo individuales limpios.
 2. Etiquetar cada tubo con el valor de pH (o, de 1 a 10) de las tablas de pH proporcionadas: pH5,4, pH6,6, pH7,3, pH7,8, pH8,2, pH8,4, pH8,8, pH9,2, pH9,6, pH10,1

3. Usar las tablas de pH para añadir cantidades variables de tampón en microlitros a cada tubo de ensayo. Agitar para mezclar.

4. Poner cada tubo en una mezcladora vorticial a baja velocidad y añadir una solución de anticuerpos (véase la sección Preparación de muestras). Mezclar bien (aproximadamente de 2 a 3 segundos).

5. Idealmente, para el oro de 40 nm, 7 µl de una solución de anticuerpo de 2 mg/ml es óptima. Para el oro de 20 nm, idealmente, 14 µl de una solución de anticuerpo de 2 mg/ml es óptima.

5. Un color púrpura que oscurece y/o un precipitado negro en algunos tubos indica que el anticuerpo o la proteína está por debajo de su punto isoeléctrico, lo que conduce a una reticulación de soles de oro individuales. Los soles reticulados no se pueden usar en ensayos inmunológicos y deben descartarse. Los soles púrpura oscuro normalmente son mayoritariamente inactivos también. Solo los tubos con un ligero color púrpura o sin cambio de color son útiles para los ensayos inmunológicos.

6. Dejar que la reacción continúe durante por un total de 30 minutos.

7. Detener la reacción por adición de 50 µl de solución estabilizadora de bloqueo.

Es mejor permitir que el bloqueador reaccione durante 16 horas adicionales a temperatura ambiente.

15. Con el fin de ensayar la eficacia de la reacción de conjugación, se mezclan 10 µl de sol de oro recubierto (antes de la adición de la solución de bloqueo de BSA) con 10 µl de NaCl 1M. Los soles con recubrimiento incompleto precipitarán de la solución (se volverán negros), mientras que los soles completamente recubiertos se mantendrán estables (rojo).

20. Después el ensayo de flujo lateral se optimiza con los reactivos descritos antes y los dispositivos de gRAD de acuerdo con el fabricante (RapidAssays, Dinamarca). SIgA, purificada de leche de cabra, y con glicosilación de Lewis analizada, se usa para procedimientos de optimización. SIgA con 0,00 mol de fucosa no central/mol de componente secretor se usa como control negativo. Como control positivo, se usa SIgA de cabra con una fucosilación no central predefinida (si se desea cribado de leche que contenga SIgA con al menos 0,01 mol de no fucosa no central/mol de componente secretor, entonces se usa una preparación SIgA con esta cantidad de glicosilación como referencia, p. ej., la muestra 12 del ejemplo 9, para la optimización. Como matriz se usa leche de cabra sin glicosilación de Lewis. Se añaden 50 µg de SIgA purificada por ml de matriz. Estas mezclas se usan como muestras positivas y negativas para la optimización del ensayo.

30. Con el fin de proporcionar leche con niveles elevados de inmunoglobulinas secretoras fucosiladas no centrales a gran escala, se analiza en las potenciales fuentes de leche la inmunoglobulina fucosilada no central con el ensayo descrito.

Solo se seleccionan muestras positivas (es decir, fucosilación no central por encima del umbral) para la mezcla.

Ejemplo 9:

Análisis de glicanos de componentes secretores de cabra que muestran las principales estructuras fucosiladas

Se usó la siguiente secuencia de componente secretor de cabra para el análisis (SEQ ID 17)

MSRFLACLAVFPVSMKSPIFGPKEVTSVEGRSVSITCYYPATSVNRHTRKYWCR
 QGATGRCTTLISSEGYVSDDYVGRAN**LT**NFPESGTFVVDISHLTR**ND**SGRYKCGLGIS
 SRGLNFDVSLEVSQDPAQASDAHIYPVDVGRVTINCPFTSANSQKRKSLCKKTGGQ
 CFLIIDSTGYKNENYEDRIRLNIAGTDTLVFSVINRVLLSDAGTYVCQAGDDAKADKS
 NVYLQVLEPEPELVYRDLRSSVTFDCSLGPEVANTAKFLCQQKNGEACNVVINTLKG
 KAQDFQGRILFLPKDNGVFSVHIASLRKEDAGRYVCGGQPEGQPEKGWPVQAWELF
 VNEETAIPASPSVVKGVKGSVTVSCLPYNPKDANSKYWCRWEEAQNGRCPRLVQ
 SKGLVKEQYKGRLLAQA**NG**TYTVILNQLTDQDAGFYWCVTDGDTSWTSTVQLK
 VVEGEPVSLKVPK**NT**AWLGEAFKLSCHFPCFKYFSEKYWCKWSNEGCSPLPTQNDG
 PSQAFVSCDQNSQIVSLNLDVTKEDGWWYCVGKVPYGETAAVYVAVESRAKG
 SQDAKQVNAAPAGGAIESRAGEIQNKALLDPRLFVEEIAVKDAAGGPGAPADPGRPA
 GHSGSSK

(Las letras en negrita indican los sitios de N-glicosilación).

Glicosilación global

La inmunoglobulina secretora se prepara según el ejemplo 11. La inmunoglobulina secretora purificada se separa en el componente secretor, cadena J, cadena H y cadena ligera mediante SDS-PAGE reductora (80x80x1 mm, gel BisTris NuPAGE al 10%, tampón de ejecución SDS MES (Invitrogen)). Las bandas de proteína se visualizan mediante tinción con Coomassie. Se usan patrones de masa molecular. Las bandas teñidas con Coomassie de aproximadamente 80 kDa se cortan en gel. Los glicanos se liberaron del componente secretor usando PNGAsaF directamente del gel de SDS-PAGE antes de digestión triptica durante 16 horas con posterior reducción con borohidruro (digestión con PNGAsa F/A después de que el tratamiento con proteasa con tripsina dejara el sitio de glicosilación N° 4 sin digerir y por lo tanto no se habría completado). El análisis de glicanos se realizó por PGC (cromatografía de carbono grafitico poroso) y detección por ESI-MS. Antes de la inyección al sistema de análisis, los glicanos se desialilaron usando una sialidasa no específica de unión de Clostridium perfringens y se analizaron de acuerdo con los tiempos de elución. Los glicanos con fucosa no central y fucosa central se pueden separar y se representan en porcentaje de los glicanos completos.

Análisis de glicopéptidos

Los sitios de glicosilación se analizan de la misma forma que los péptidos usando RP-ESI-MSM. Las estructuras se eluyen de acuerdo con la cadena principal peptídica y muestra una determinada distribución de masa debido a la heterogeneidad de la glicosilación.

El análisis de péptidos y glicopéptidos se lleva a cabo en un sistema capilar LC-ESI-MS que consiste en una precolumna Aquasil C-18 (30 mm x 0,32 mm, 5 micrómetros, Thermo Scientific), una columna analítica BioBasic C18 (150 mm x 0,18 mm, 5 micrómetros, Thermo Scientific), un Waters CapLC, una válvula Rheodyne de 10 puertos y un Waters Q-TOF Ultima con fuente estándar de ESI. El disolvente A consiste en formiato de amonio 65 mM de pH 3,0 y el disolvente B es acetonitrilo al 80% (ACN) en el disolvente A. La precolumna se equilibra y se carga en ausencia de ACN. Después, se desarrolla un gradiente de 6,3 a 62,5% de disolvente B a lo largo de 45 minutos. Se miden los iones positivos en el intervalo de m/z 150 a 1800. La tensión capilar es de 3,2 kV y la tensión de cono de 35 V, la temperatura de la fuente es 100°C, la temperatura de desolvatación es 120°C.

Los datos se evalúan usando el software MassLynx 4.0, que incluye la función de deconvolución/desisotopado MaxEnt3 (Waters). Los péptidos glicosilados se identifican por desglicosilación con PNGnasa F (Roche) y posterior separación en HPLC de fase inversa seguido de espectroscopía de masas. El péptido desglicosilado contiene un ácido glutámico en lugar de un resto de glutamina, lo que da como resultado una diferencia de masa de 1 Da.

Diferentes estructuras de glicanos en la misma cadena principal peptídica dividen la posible señal de glicopéptidos en varias especies moleculares de diferente masa. La presencia de glicopéptidos también se puede indicar en un espectro de masas total como una escalera de masas con pasos basados en diferencias específicas de monosacáridos (p. ej., m/z 146 [Fucosa], 162 [Hexosa], 203 [N-acetilhexosamina], 291 [ácido N-acetil-neuramínico]) entre las diferentes glicofomas.

Una vez que se identifican los picos de glicopéptidos, se mide el "volumen" de pico, es decir, el área bajo los picos correspondientes a un glicopéptido particular. El volumen del pico se puede traducir directamente en proporciones molares de glicofomas ya que la ionización y, por lo tanto, la detección de los glicopéptidos está dominada por la parte del péptido. Los espectros de masas se adquieren durante el tiempo de elución de un glicopéptido identificado o potencial y se suman, suavizan y se centran antes de enviar el espectro m/z frente a intensidad al software para su análisis.

Para aumentar la relación señal/ruido para glicofomas de baja intensidad, se recomienda sumar los espectros de MS solo en el pico de elución respectivo en lugar de a lo largo de un marco de tiempo cromatográfico más amplio. De la lista de glicofomas que se producen en un sitio de glicosilación particular, se calcula la fracción molar de glicanos fucosilados. Los resultados para los diferentes sitios se suman para llegar a la proporción molar de glicanos fucosilados que se producen en el componente secretor.

Se identificaron los siguientes péptidos con sitios de glicosilación:

sitio de glicosilación n° 1 ANLTFNPE (SEQ ID 18) posición 82-89

sitio de glicosilación n° 2 NDSGR (SEQ ID 19) posición 103-107

sitio de glicosilación n° 3 LALLAQPGNGTYTVILNQLTDQDAGFYWCVTGDTSWTSTVQLK (SEQ ID 20) posición 412-455

sitio de glicosilación n° 4 NVTAWLGE (SEQ ID) 468-476

Aunque los sitios de glicosilación 1, 2 y 4 se podían detectar durante el procedimiento analítico el péptido con sitio de glicosilación n° 3 permanecía sin explorar, usando también otras proteasas y espectrómetros de masas.

La siguiente tabla muestra el contenido molar de fucosa no central del componente secretor de diferentes muestras de leche de cabra.

Tabla 1: Análisis de fucosas no centrales del componente secretor de cabra (en los sitios de glicosilación 1, 2 y 4 (mmol por mol de SC)).

Muestra nº	fucosa no central (mmol por mol SC)
5	1,99
6	3,08
11	9,00
12	18,47
13	5,32
21	4,64
22	0,00
23	0,60
27	4,95
30	0,12
32	4,96
33	3,82

5

Ejemplo 10

Ensayo de citotoxicidad celular

Se cultivan células Vero hasta una monocapa confluyente y se subcultivan por incubación de 2 ml de tripsina al 0,1% en EDTA 1 mM. Las células se cuentan y se siembran $6,25 \times 10^4$ células/ml en placas de 96 pocillos en un volumen total de 80 μ l. Las placas se incuban durante 20-24 h a 37°C y 5% de CO₂. La toxina A de *Clostridium difficile* (List Biological Laboratories, Campbell, CA, EE.UU., Cat. Nº 152) se diluye con PBS (PAA, Austria) hasta una concentración final de 0,2 μ g/ml y se incuba con diluciones de hSIgA humana (Sigma n. ° I1010) , respectivamente, SIgA bovina (<10 mmol de fucosa no central/mol) y SIgA de cabra obtenida según el ejemplo 11 (muestra nº 6 <10 mmol de fucosa no central/mol, muestra nº 12 > 10 mmol de fucosa no central/mol) durante 1 hora a 37°C. La SIgA humana se usa en un exceso molar de diez veces en comparación con la toxina, así como equimolar. La SIgA bovina y de cabra se usa equimolar. La albúmina de suero bovino (New England Biolabs) y PBS (solución salina tamponada con fosfato) sirven como controles negativos. Las mezclas de toxina A/anticuerpo se añaden a placas de 96 pocillos en un orden aleatorio y se incuban durante 48 h adicionales. Se añaden 10 μ l de WST-8 (Sigma) a cada pocillo y las placas se incuban durante 2-4 h a 37°C. Las células viables producen un colorante de formazán amarillo soluble en agua por reducción con deshidrogenasas que es proporcional al número de células. La absorbancia a 450 nm se determina usando un lector de microplacas (Tecan® Infinity-1000). Cada tiempo de medición se realiza por triplicado. La Fig. 16 muestra los resultados de dos muestras de SIgA de cabra, una muestra de SIgA bovina y la muestra de hSIgA humana como control. El resultado muestra que el nivel de neutralización de la toxina A en este ensayo se correlaciona con la cantidad de fucosilación no central en las respectivas muestras.

25 Ejemplo 11:

Preparación de inmunoglobulina secretora a partir de muestras de leche

Este ejemplo describe la preparación a escala piloto de inmunoglobulina secretora a partir de muestras de leche.

Materiales y métodos

Preparación de suero de leche

30 Para todas las etapas de centrifugación, se usó una centrífuga Beckman-Coulter™ Avanti J-25 con el rotor JLA10.500. Se usaron vasos de precipitados con un volumen nominal de 0,5 litros, pero se llenaron solo hasta 0,4 litros.

Deslipidación

La deslipidación se realizó por centrifugación a 11827 g (8000 RPM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El líquido sobrenadante se usó para preparación adicional. El sedimento (grasa) fue descartado.

Precipitación ácida de la caseína

- 5 La precipitación ácida se realizó añadiendo lentamente una solución de HCl al 5% con agitación energética constante de la leche deslipidada hasta que se obtuvo un pH de 4,6.

Separación de precipitado

La separación del precipitado se realizó por centrifugación a 14969 g (9000 RPM), durante 45 minutos a temperatura ambiente. El líquido sobrenadante se usó para preparación adicional. El sedimento (precipitado) se descartó.

- 10 Filtración de profundidad

El suero se filtró usando una bomba peristáltica (Watson-Marlow X-100) y una unidad de filtro estéril (Sartorius-Stedim Sartobran P 0,45 + 0,2 µm de tamaño de poro; área de filtración 0,1 m²).

Ultra/Diafiltración

Equipo

- 15 Sistema Millipore Labscale™ TFF

Sistema Millipore Cogent µScale TFF

Membranas de filtración

GE Healthcare Kwick™ Start 100 kD 50 cm²

GE Healthcare Kwick™ Lab 100 kD 100 cm²

- 20 Concentración y diafiltración de suero de leche

Para el sistema Millipore Labscale™ TFF se usaron 3 membranas para ultrafiltración y diafiltración de suero de leche, con un área total de membrana de 0,015 m². El ajuste de la bomba era 2 y se ajustó una presión transmembrana de aproximadamente 2,5 bar. El suero de leche se concentró ~ 1:25 y se diafiltró con solución salina tamponada con fosfato (PBS), mientras que el suero de leche concentrado se intercambió con tampón con un exceso de 7 veces de PBS.

- 25 Sistema Millipore Cogent µScale TFF: se usaron 3 membranas con un área total de membrana de 0,03 m². El ajuste de la bomba fue 40% del flujo máximo, que corresponde a aproximadamente 150 ml/min, la presión transmembrana a 2,5 bar.

El flujo de permeado se midió pesando la muestra de permeado en distintos intervalos de tiempo.

- 30 SEC preparativa

Superose 6

Se usó el empaquetado de calidad preparativa de Superose 6 en una columna HiScale™ 26/40. La altura del lecho era 32,5 cm y el volumen de la columna era 173 ml. El caudal era 30 cm/h (2,65 ml/min) y el volumen de muestra era 15 ml, lo que corresponde al 4,7% del volumen de la columna (VC). El fraccionamiento se llevó a cabo de 0,3 VC a 0,57 VC con un tamaño de fracción de 5 ml. El tampón de equilibrado y ejecución era 1x PBS.

- 35 Superdex 200
- Se usó una columna de HiLoad™ de grado preparativa Superdex 200 26/60. La altura del lecho era 59,7 cm y el volumen de la columna era 317 ml. Las condiciones de ejecución eran las mismas que las descritas para Superose 6.

- 40 Muestras de leche

La leche bovina y de oveja se obtuvo de tiendas locales de alimentos, todas las muestras de suero de leche de cabra y de leche de cabra se obtuvieron de Hofkäserei Dörfel (Untere Bergstrasse 1, 3041 Dörfel, Austria).

SEC Analítico

Se usó un sistema HP Chemstation 1100 (Agilent) para la SEC analítica. Las columnas eran Superose 6 10/300 GL y Superdex 200 10/300 GL, ambas de GE Healthcare. El caudal era de 0,5 ml/min y el volumen de inyección era 50 µl. El tampón de equilibrado y ejecución era 1x PBS. Las señales de UV se registraron a 214 nm.

SDS-PAGE

5 Las muestras se añadieron con DTT a una concentración final de 200 mM y tampón de muestra LDS NuPAGE (4x) y se hirvieron durante 10 minutos. Las muestras se cargaron en geles de Tris-Acetato al 3-8%, el tampón de ejecución era 1x tampón de ejecución de SDS Tris-Acetato NuPAGE. Las condiciones de ejecución eran 150 V, amperio máximo, 1,5 horas. El marcador era el patrón de proteína de alto peso molecular preteñido HiMark de Invitrogen. La tinción con proteína se llevó a cabo con azul de Coomassie.

10 Transferencia puntual

Se aplicaron porciones de 5 µl de muestras de los experimentos de SEC preparativa a una membrana de nitrocelulosa. Después de secado al aire de las muestras, las membranas se bloquearon con BSA al 3% durante 1 hora y se lavaron 3 x con tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,1% (tampón de lavado). Posteriormente, las membranas se incubaron con conjugados de anticuerpo específico-HRP durante 1 hora. Se usaron los siguientes conjugados: 1) Anticuerpo de conejo-anti-IgM de cabra-HRP, número de producto AAI45P; 2) Anticuerpo de conejo-anti-IgG de cabra(H/L)-HRP, número de producto 5160-2504; 3) Anticuerpo de conejo-anti-IgA de cabra-HRP, número de producto AAI44P (AbD Serotec, Alemania). La solución madre de conjugado se diluyó a 1:30000-1:50000 con tampón de lavado que contenía BSA al 1%. Después de lavar 3 x con tampón de lavado, se realizó la señalización con SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Alemania) y el escáner Lumi-ImagerTM de Boehringer Mannheim.

20 Se estableció un equilibrio de masas completo del proceso como se describe en 3.4.1 y se muestra para dos muestras de leche de cabra (muestras nº 11 y 12 del ejemplo 9) en la tabla 2. Todos los perfiles de pico del análisis de HPLC se desconvolucionaron en sus inmunoglobulinas individuales. Después, el contenido de SIgA se calculó basándose en la pureza y la cantidad de proteína obtenida a partir de los datos del experimento preparativo. El contenido de IgA de la leche de cabra a partir de los datos de la bibliografía es 30-80 µg/ml. Estos valores sirvieron como base para el cálculo del rendimiento teórico.

Tabla 2: Equilibrio de masas, rendimiento y pureza del procesamiento de las muestras 11 y 12

	Muestra 11	Muestra 12
Volumen inicial de leche [ml]	900	900
Volumen de suero de leche [ml]	875	875
Volumen de suero de leche concentrado [ml]	35	35
Factor de concentración	1:25	1:25
Volumen de muestra de suero de leche concentrado aplicado [ml]	15 (42% del volumen total)	15
Fraccionamiento (tamaño de fracción, fracciones que contienen IgA)	5 ml, F7-F9	5 ml, F6-F10
Fracción C (IgA) F6 [µg/ml]; cantidad total [µg]; pureza %	-	295; 1475; 24%
Fracción C (IgA) F7 [µg/ml]; cantidad total [µg]; pureza %	308; 1540; 39%	412; 2060; 40%
Fracción C (IgA) F8 [µg/ml]; cantidad total [µg]; pureza %	420; 2101; 76%	782; 3910; 90%
Fracción C (IgA) F9 [µg/ml]; cantidad total [µg]; pureza %	403; 2017; 71%	305; 1527; 44%
Fracción C (IgA) F10 [µg/ml]; cantidad total [µg]; pureza %	-	172; 861; 36%
Cantidad total de IgA [mg]; rendimiento teórico ¹ [mg] (%)	5,7; 11,6-30,8 (49-19%)	9,8; 11,6-30,8 (84-32%)

¹ se utilizó la cantidad teórica de IgA total basada en el 42% del volumen de muestra

Ejemplo 12:

30 ELISA para unión de DC-SIGN

ES 2 691 619 T3

Este ejemplo muestra que se pueden cribar muestras de leche individuales según la glicosilación específica de Lewis en la IgA secretora. Se sabe que la lectina DC-SIGN se une a las estructuras del grupo sanguíneo de Lewis y, por lo tanto, se puede usar como un antígeno de cribado.

ELISA de cribado según la reactividad de DC-SIGN de SIgA en muestras de leche de cabra individuales

- 5 El ELISA se realiza en inmunoplasmas NUNC de 96 pocillos.
- Recubrimiento: proteína de fusión DC-SIGN-Fc (R&D Systems, nº 161-DC-050; solución madre 100 µg/ml) diluida 1:100 en tampón de recubrimiento reciente 100 µl/pocillo, incubación durante 4°C durante la noche. Lavar 3 x con PBS-Tween, después incubar con PBS-Tween 300 µl/pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con PBS-Tween.
- 10 Preparación de la muestra: se toman muestras recientes de 10 ml de leche de cabras individuales y se centrifugan a 40.000 x g durante 30 min a 4°C. La capa de grasa se separa con una espátula; el líquido restante se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga y se centrifuga de nuevo a 40.000 x g durante 30 min. La capa líquida (suero de leche) se divide en partes alícuotas y se almacena a -20°C o se usa para el cribado directo.
- Como muestra positiva, se usa hSIgA humana (Sigma nº I1010) en una concentración de 5 µg/ml.
- 15 Como control negativo se usa leche de cabra "Ja Natürlich" Ziegenmilch, Sennerei Zillertal, Austria.
- Las muestras se añaden siempre en dos diluciones, 1:2 y 1:10 diluidas en tampón de conjugado, 100 µl/pocillo, incubación durante 2 h a temperatura ambiente.
- Después de 3 lavados con PBS-Tween, se añade el conjugado a los pocillos (100 µl, conjugado de anticuerpo anti-IgA de cabra-fosfatasa alcalina, abcam nº ab112864, diluido 1:1000 en tampón conjugado) y se incuba durante 1,5 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 20 Para los controles positivos, se usa anticuerpo anti-IgA humana-fosfatasa alcalina (Acris nº R1342AP, 1:1000). Los pocillos se lavan posteriormente 3 veces con PBS-Tween. La detección se hace con 100 µl de sustrato colorigénico (1 mg de para-nitrofenil-fosfato/ml de tampón de tinción), incubación a temperatura ambiente.
- Las placas se miden después de 30 minutos en un fotómetro de microplacas a 405 nm (longitud de onda de referencia 620 nm).
- 25 Tampón de recubrimiento: 0,42 g de Na₂CO₃ + 0,84 g de NaHCO₃ + 100 ml de A.D., = pH 9,7, almacenar a 4°C, uso máx. 3 días
- Solución de bloqueo/Tampón de lavado: 100 ml de PBS + 100 µl de Tween 20 (= 0,1%), siempre reciente
- Tampón de conjugado: 10 g de PVP + 250 µl de Tween 20 + 0,1 g de MgCl₂ + 500 ml de PBS, ajuste el pH a 7,4
- 30 Almacenar a 4°C, conservar opcionalmente añadiendo NaH₃
- Tampón de tinción: 47,8 ml de di-etanolamina + 3,3 ml de sol. de MgCl₂ 75mM + 448,9 ml de A.D., ajuste el pH a 9,8 (cuando se tenga prisa, se puede usar tampón de recubrimiento en su lugar, pero la señal será más débil), almacenar a 4°C, conservar opcionalmente añadiendo NaH₃
- Los resultados de 2 placas de ELISA se muestran en la Fig. 17
- 35 La evaluación estadística de los datos de ELISA (solo se usan los valores de DO (densidad óptica) de dilución 1:2 para ilustrar la evaluación):
- Placa A:
- DO media de los controles negativos: 0,082
- Desviación estándar de los controles negativos: 0,061
- 40 Umbral de positividad (media de los controles más 3 veces la desviación estándar): 0,265
- Muestras positivas (DO por encima del umbral)
- muestra 41 (1,041)
- muestra 48 (0,744)
- muestra 56 (0,691)
- 45 muestra 69 (0,286)

Placa B:

DO media de los controles negativos: 0,130

Desviación estándar de los controles negativos: 0,074

Umbral de positividad (media de los controles más 3 veces la desviación estándar): 0.352

5 Muestras positivas (DO por encima del umbral)

muestra 90 (0,584)

muestra 91 (0,385)

muestra 107 (1,627)

muestra 109 (0,498)

10 muestra 112 (1,100)

muestra 115 (0,371)

muestra 132 (0,889)

Todas las muestras positivas se mezclan.

15 La positividad para la unión de DC-SIGN (que corresponde a glicosilación de Lewis) se puede deber a diferencias de estos animales en comparación con otros animales en términos de raza, alimentación, estado de salud, etc.

Para la preparación industrial de leche que contiene el inmunocomplejo descrito en la presente memoria, los animales individuales se vuelven a analizar a intervalos regulares con el fin de asegurar la recogida de leche con alto contenido de inmunoglobulina secretora fucosilada no central.

20 La leche de dichos animales que produce resultados positivos de DC-SIGN en ELISA se recoge por separado y posteriormente se procesa. Tan pronto como la leche de un individuo se determina que es negativa, la leche posterior del respectivo individuo ya no se usa para la preparación de una mezcla de leches que contiene componente secretor enriquecido con glicosilación de Lewis e complejos inmunes.

Cuando se usa como referencia una muestra de al menos 10 mmol de fucosa no central por mol de SC o SIgA, el ensayo se puede calibrar para determinar el mayor o menor nivel que la referencia.

25 Ejemplo 13

Unión de SC humano recombinante a DC-SIGN

30 Con el fin de mostrar el efecto sorprendente de la fucosilación no central del SC recombinante, la proteína se produce por transfección del gen para SC en células adecuadas. El gen de la Fig. 2 se inserta en los sitios HindIII y XbaI en el vector pCDNA3.1 + (invitrogen, EE.UU.) como se describe en el ejemplo 2 en CHO LEC11 (línea celular y técnicas de transfección de acuerdo con Rittershaus et al. *J Biol Chem*. Vol. 274, pág.11237-44).

Como control, se usa CHO DUK-(ATCC CRL 9096) según Phalipon et al. 2002, *Immunity*, vol. 17, pág. 107-115) como hospedante de expresión para el gen del componente secretor.

Los líquidos sobrenadantes de los clones de CHO se ensayan por ELISA específico para el componente secretor y la glicosilación de Lewis:

35 El cribado se lleva a cabo en un formato de ELISA estándar. Las placas ELISA (Nunc Maxi-Sorp Immuno Plate) de los líquidos sobrenadantes de cultivos celulares se recubren con anticuerpos anti-componente secretor humano (Ray Biotech nº DS-PB-03010, EE.UU.) en una concentración de 1 microgramo por ml de tampón de recubrimiento (3,03 g de Na₂CO₃, 6,0 g de NaHCO₃ en 1000 ml de agua destilada, pH 9,6) a 100 microlitros por pocillo.

Las placas se cierran con una tapa y se incuban durante la noche a 4°C.

40 Antes de la siguiente etapa, se retira la solución de recubrimiento y las placas se lavan tres veces llenando los pocillos con 200 µl de TPBS (1,16 g de Na₂HPO₄, 0,1 g de KCl, 0,1 g de K₃PO₄, 4,0 g de NaCl en 500 ml de agua destilada, Tween20 al 0,05% (v/v), pH 7,4). Las soluciones o lavados se eliminan sacudiendo la placa sobre un fregadero. Las gotas restantes se eliminan dando golpecitos a la placa sobre una toalla de papel. Alternativamente, el lavado se puede llevar a cabo con un lavador ELISA.

ES 2 691 619 T3

Las placas se llenan con tampón de bloqueo Superblock (Thermo nº 37515) 150 microlitros/pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

De nuevo, las placas se lavan como se ha descrito antes.

5 Los líquidos sobrenadantes del cultivo celular se diluyen en TPBS de muestra (1:2 y 1:10). Se añaden 16 controles negativos para cada dilución (1:2 y 1:10) a cada placa. Se añaden 4 muestras de control positivo para cada dilución a la placa. Se añaden 100 microlitros de las diluciones respectivas a los pocillos de la placa lavada y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas.

10 Después del lavado, se añaden 100 microlitros de anticuerpo anti-sialil-Lewis x (Merck Millipore, MAB2096) a una dilución de 1:100 en TPBS a los respectivos pocillos de muestra y a los pocillos de muestra de control negativo y positivo.

La placa se incuba de nuevo durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se lava.

Después, se añaden 100 microlitros por pocillo de un anticuerpo de pollo anti-IgG de ratón-HRP (Thermo, nº SA1-72029, 1:500 en TPBS) y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las placas se lavan tres veces con TPBS.

15 Después se lleva a cabo una etapa de lavado adicional con tampón de sustrato (kit de sustrato TMB, Vector Laboratories nº SK-4400, EE.UU.). A continuación, se añade sustrato cromogénico (Vector Laboratories SK-4400). Después de una incubación corta (medición del control positivo a DO 650 > 1,0, control negativo DO < 0,2) se añaden 50 microlitros de ácido sulfúrico 1 N y la placa se lee en el lector de microplaca a DO450, compensado por DO600 como en técnicas ELSA estándar usando TMB como sustrato.

20 Se puede mostrar que el SC humano recombinante expresado en LEC11 presenta sialil-Lewis x. Por el contrario, la expresión de SC recombinante en CHO normal (CHO DUK-) no muestra ninguna fucosilación no central.

Purificación:

25 La purificación del componente secretor recombinante del líquido sobrenadante de células animales y la IgA secretora se lleva a cabo por cromatografía de afinidad con el anticuerpo de conejo anti-componente secretor humano acoplado a Sepharose según los protocolos convencionales para la cromatografía de afinidad.

Desialilación:

100 microgramos de SC recombinante se desialilan en un volumen de reacción de 30 microlitros con 0,1 unidades de Sialidasa A (Prozyme, Cat. nº GK80040) en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 a 37°C durante 8 horas.

30 Después de desalinización con PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare, cat. nº 28-9180-04) según el fabricante, se ensaya en la proteína recombinante SC por ELISA la unión a DC-SIGN

ELISA de DC-SIGN

El ensayo ELISA se realiza en inmunoplasmas NUNC de 96 pocillos.

35 Recubrimiento: la proteína de fusión DC-SIGN-Fc (R&D Systems, nº 161-DC-050; solución madre 100 µg/ml) se diluye 1:100 en tampón de recubrimiento reciente (0,42 g de Na₂CO₃ + 0,84 g de NaHCO₃ + 100 ml de A.D., = pH 9,7, almacenar a 4°C, usar máximo 3 días).

El recubrimiento se añade en 100 µl/pocillo, la incubación se lleva a cabo a 4°C durante la noche.

Se lava 3 x con PBS-Tween, después se incuba con PBS-Tween con 300 µl/pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lava de nuevo 3 x con PBS-Tween.

Muestras:

40 Las preparaciones de SC recombinante producidas con células CHO DUK- así como con CHO LEC11, antes y después del tratamiento con sialidasa respectivamente, en una concentración inicial de 1 microgramo por ml, se diluyen de forma seriada (en 1:5 etapas) en tampón de conjugado. Se añaden 100 µl de cada dilución por duplicado a la placa recubierta y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente.

45 Después de 3 lavados con PBS-Tween, el conjugado se añade a los pocillos (100 µl, conjugado anticuerpo anti-SC humano-HRP, Acris nº AP21476HR-N, diluido 1:1000 en tampón conjugado) y se incuba durante 1,5 horas a temperatura ambiente.

Los pocillos se lavan posteriormente 3 veces con PBS-Tween. A continuación, se lleva a cabo una etapa de lavado adicional con tampón de sustrato (kit de sustrato TMB, Vector Laboratories nº SK-4400, EE.UU.). Después, se añade sustrato cromogénico (Vector Laboratories SK-4400). Después de una incubación corta, se añaden 50 microlitros de

ES 2 691 619 T3

ácido sulfúrico 1 N y la placa se lee en el lector de microplaca a DO450, compensado por DO600 como en las técnicas de ELSA estándar que usan TMB como sustrato.

Solución de bloqueo/Tampón de lavado: 100 ml de PBS + 100 µl de Tween 20 (= 0,1%)

5 Tampón de conjugado: 10 g de PVP + 250 µl de Tween 20 + 0,1 g de MgCl₂ + CaCl₂ 1 mM + 500 ml de PBS, ajuste de pH a 7,4

PBS es solución salina tamponada con fosfato con Ca 1 mM.

Almacenar a 4°C, conservar opcionalmente añadiendo NaH₃

10 Se puede mostrar que el SC recombinante desialilado de CHO LEC11 se une más fuerte al DC-SIGN en comparación con el componente secretor desialilado producido en CHO DUK, así como el SC sialilado expresado en CHO LEC11.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Himmler, Gottfried

<120> Complejo de inmunoglobulina secretora

15

<130> HI001P

<160> 21

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 607

<212> PRT

25

<213> humano

<400> 1

ES 2 691 619 T3

Met Leu Leu Phe Val Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Ala Ile
 1 5 10 15

Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu
 20 25 30

Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn
 35 40 45

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys
 50 55 60

Ile Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly
 65 70 75 80

Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn
 85 90 95

Ile Ala Gln Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
 100 105 110

Gly Ile Asn Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
 115 120 125

Gln Gly Pro Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu
 130 135 140

Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val
 165 170 175

ES 2 691 619 T3

Ile Asp Ser Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg
 180 185 190

Leu Asp Ile Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn
 195 200 205

Gln Leu Arg Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp
 210 215 220

Asp Ser Asn Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro
 225 230 235 240

Glu Pro Glu Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His
 245 250 255

Cys Ala Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg
 260 265 270

Gln Ser Ser Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285

Arg Ala Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys
 290 295 300

Asp Gly Ser Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala
 305 310 315 320

Gly Arg Tyr Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly
 325 330 335

Ser Pro Ile Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile
 340 345 350

Pro Arg Ser Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Ser Ser Val Ala
 355 360 365

Val Leu Cys Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp
 370 375 380

Cys Leu Trp Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp
 385 390 395 400

Ser Glu Gly Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu
 405 410 415

Glu Glu Pro Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr
 420 425 430

ES 2 691 619 T3

Ser Arg Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu
 435 440 445

Trp Arg Thr Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu
 450 455 460

Lys Val Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val
 465 470 475 480

Pro Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys
 485 490 495

Lys Trp Asn Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly
 500 505 510

Pro Ser Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser
 515 520 525

Leu Thr Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys
 530 535 540

Gly Val Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val
 545 550 555 560

Ala Val Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala
 565 570 575

Lys Ala Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg
 580 585 590

Glu Ile Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu
 595 600 605

<210> 2
 <211> 1844
 <212> ADN
 <213> humano

5

<400> 2
 ccccaagctt atgctgctgt tcgtgctgac ctgcctgctg gccgtgttcc ccgccatcag 60
 caccaagagc cccatcttcg gccccgagga ggtgaacagc gtggagggca acagcgtgag 120
 catcacctgc tactaccccc ccaccagcgt gaacagacac accagaaagt actggtgcag 180
 acagggcgcc agagggcggt gcatcaccct gatcagcagc gagggctacg tgagcagcaa 240
 gtacgccggc agagccaacc tgaccaactt ccccgagaac ggcaccttcg tggatgaacat 300
 cgcccagctg agccaggacg acagcggcag atacaagtgc ggcctgggca tcaacagcag 360

10

ES 2 691 619 T3

```

aggcctgagc ttcgacgtga gcctggaggt gagccagggc cccggcctgc tgaacgacac      420
caaggtgtac accgtggacc tgggcagaac cgtgaccatc aactgcccct tcaagaccga      480
gaacgcccag aagagaaaga gcctgtacaa gcagatcggc ctgtaccccg tgctggtgat      540
cgacagcagc ggctacgtga accccaacta caccggcaga atcagactgg acatccaggg      600
caccggccag ctgctgttca gcgtggtgat caaccagctg agactgagcg acgcccggcca      660
gtacctgtgc caggccggcg acgacagcaa cagcaacaag aagaacgccg acctgcaggt      720
gctgaagccc gagcccgagc tgggtgtacga ggacctgaga ggcagcgtga ccttccactg      780
cgccctgggc cccgaggtgg ccaacgtggc caagttcctg tgcagacaga gcagcggcga      840
gaactgcgac gtggtggtga acaccctggg caagagagcc cccgccttcg agggcagaat      900
cctgctgaac ccccaggaca aggacggcag cttcagcgtg gtgatcaccg gcctgagaaa      960
ggagagcggc ggcagatacc tgtgcggcgc ccacagcgac ggccagctgc aggagggcag     1020
ccccatccag gcctggcagc tgttcgtgaa cgaggagagc accatccccca gaagccccac     1080
cgtggtgaag ggcgtggccg gcagcagcgt ggccgtgctg tgcccctaca acagaaagga     1140
gagcaagagc atcaagtact ggtgcctgtg ggagggcgcc cagaacggca gatgccccct     1200
gctggtggac agcgagggct ggggtgaaggc ccagtacgag ggcagactga gcctgctgga     1260
ggagcccggc aacggcacct tcaccgtgat cctgaaccag ctgaccagca gagacgcccg     1320
cttctactgg tgcctgacca acggcgacac cctgtggaga accaccgtgg agatcaagat     1380
catcgagggc gagcccaacc tgaaggtgcc cggcaacgtg accgccgtgc tgggcgagac     1440
cctgaaggtg ccctgccact tcccctgcaa gttcagcagc tacgagaagt actggtgcaa     1500
gtggaacaac accggctgcc aggccctgcc cagccaggac gagggcccca gcaaggcctt     1560
cgtgaactgc gacgagaaca gcagactggt gagcctgacc ctgaacctgg tgaccagagc     1620
cgacgagggc tggtagtggc gggcggtgaa gcagggccac ttctacggcg agaccgcccg     1680
cgtgtacgtg gccgtggagg agagaaaggc cgccggcagc agagacgtga gcctggccaa     1740
ggccgacgcc gccccgacg agaaggtgct ggacagcggc ttcagagaga tcgagaacaa     1800
ggccatccag gaccccagac tgttcgccga gtgatctaga cccc                          1844

```

```

<210> 3
<211> 343
5 <212> PRT
  <213> humano

```

```

<400> 3
Met Leu Val Val Gln Met Pro Phe Ser Phe Pro Met Ala His Phe Ile
1           5           10           15

```

```

Leu Phe Val Phe Thr Val Ser Thr Ile Phe His Val Gln Gln Arg Leu

```

10

ES 2 691 619 T3

Lys Asp Phe Ala Leu Leu Thr Gln Cys Asn His Thr Ile Met Thr Ile
 275 280 285

Gly Thr Phe Gly Ile Trp Ala Ala Tyr Leu Thr Gly Gly Asp Thr Ile
 290 295 300

Tyr Leu Ala Asn Tyr Thr Leu Pro Asp Ser Pro Phe Leu Lys Ile Phe
 305 310 315 320

Lys Pro Glu Ala Ala Phe Leu Pro Glu Trp Thr Gly Ile Ala Ala Asp
 325 330 335

Leu Ser Pro Leu Leu Lys His
 340

<210> 4
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> humano

5

<400> 4
 gctagcatgc tggtagtgca gatgccgttt agctttccga tggcgcatth tattctgttt 60
 gtgtttaccg tgagcaccat ttttcatgtg cagcagcgcc tggcgaaaat tcaggcgatg 120
 tgggaactgc cggtgcagat tccggtgctg gcgagcacca gcaaagcgct gggcccagagc 180
 cagctgcgag gcatgtggac cattaacgag attgcccgcc tgggcaacca gatggcgcaa 240
 tatgcgaccc tgtatgcgct ggcgaaaatg aacggccgcc cggcgtttat tccggcgagc 300
 atgcatagca ccctggcgcc gatttttcgc attaccctgc cggtgctgca tagcgcgacc 360
 gcgagccgca ttccgtggca gaactatcat ctgaacgatt ggatggaaga agaatatcgc 420
 catattccgg gcgaatatgt ggcctttacc ggctatccgt gcagctggac cttttatcat 480
 catctgcgcc aggaaattct gcaggaattt accctgcatg atcatgtgag cgaagaagcg 540
 cagaaatttc tgcgcccctt gcaggtgaac ggcagccgcc cgggcacctt tgtgggctg 600
 catgtgcgcc gcggcgatta tgtgcatgtg atgccgaaag tgtggaaag cgtggtggcg 660
 gatcgcgct atctgcagca ggcgctgat tggtttcgag cgcgctatag cagcctgatt 720
 tttgtggtga ccagcaacg catggcgtgg tgcccgaaa acattgatac cagccatggc 780
 gatgtggtgt ttgcgggca tggcattgaa ggcagcccgg cgaagattt tgcgctgctg 840
 acccagtgca accataccat tatgaccatt ggcaccttg gcatttgggc ggcgtatctg 900
 accggcggcg ataccattta tctggcgaac tataccctgc cggatagccc gtttctgaaa 960
 attttaaac cgaagcggc gtttctgccg gaatggaccg gcattgcggc ggatctgagc 1020
 ccgctgctga aacattaaga attc 1044

10

<210> 5
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> humano

15

<400> 5

ES 2 691 619 T3

Met Asp Pro Leu Gly Ala Ala Lys Pro Gln Trp Pro Trp Arg Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Leu Leu Phe Gln Leu Leu Val Ala Val Cys Phe Phe Ser
 20 25 30

Tyr Leu Arg Val Ser Arg Asp Asp Ala Thr Gly Ser Pro Arg Ala Pro
 35 40 45

Ser Gly Ser Ser Arg Gln Asp Thr Thr Pro Thr Arg Pro Thr Leu Leu
 50 55 60

Ile Leu Leu Arg Thr Trp Pro Phe His Ile Pro Val Ala Leu Ser Arg
 65 70 75 80

Cys Ser Glu Met Val Pro Gly Thr Ala Asp Cys His Ile Thr Ala Asp
 85 90 95

Arg Lys Val Tyr Pro Gln Ala Asp Met Val Ile Val His His Trp Asp
 100 105 110

Ile Met Ser Asn Pro Lys Ser Arg Leu Pro Pro Ser Pro Arg Pro Gln
 115 120 125

Gly Gln Arg Trp Ile Trp Phe Asn Leu Glu Pro Pro Pro Asn Cys Gln
 130 135 140

His Leu Glu Ala Leu Asp Arg Tyr Phe Asn Leu Thr Met Ser Tyr Arg
 145 150 155 160

Ser Asp Ser Asp Ile Phe Thr Pro Tyr Gly Trp Leu Glu Pro Trp Ser
 165 170 175

Gly Gln Pro Ala His Pro Pro Leu Asn Leu Ser Ala Lys Thr Glu Leu
 180 185 190

Val Ala Trp Ala Val Ser Asn Trp Lys Pro Asp Ser Ala Arg Val Arg
 195 200 205

Tyr Tyr Gln Ser Leu Gln Ala His Leu Lys Val Asp Val Tyr Gly Arg
 210 215 220

ES 2 691 619 T3

Ser His Lys Pro Leu Pro Lys Gly Thr Met Met Glu Thr Leu Ser Arg
225 230 235 240

Tyr Lys Phe Tyr Leu Ala Phe Glu Asn Ser Leu His Pro Asp Tyr Ile
245 250 255

Thr Glu Lys Leu Trp Arg Asn Ala Leu Glu Ala Trp Ala Val Pro Val
260 265 270

Val Leu Gly Pro Ser Arg Ser Asn Tyr Glu Arg Phe Leu Pro Pro Asp
275 280 285

Ala Phe Ile His Val Asp Asp Phe Gln Ser Pro Lys Asp Leu Ala Arg
290 295 300

Tyr Leu Gln Glu Leu Asp Lys Asp His Ala Arg Tyr Leu Ser Tyr Phe
305 310 315 320

Arg Trp Arg Glu Thr Leu Arg Pro Arg Ser Phe Ser Trp Ala Leu Asp
325 330 335

Phe Cys Lys Ala Cys Trp Lys Leu Gln Gln Glu Ser Arg Tyr Gln Thr
340 345 350

Val Arg Ser Ile Ala Ala Trp Phe Thr
355 360

<210> 6
<211> 1100
5 <212> ADN
<213> humano

<400> 6
tctagaatgg atccgctggg cgcgggcga aa ccgcagtgcc cgtggcgccg cagcctggcg 60
gcgctgctgt ttcagctgct ggtggcggtg tgctttttta gctatctgcg cgtgagccgc 120
gatgatgcga ccggcagccc gcgcgcgccg agcggcagca gccgccagga taccaccccg 180
accgcccga ccctgctgat tctgctgcgc acctggccgt ttcatttcc ggtggcgctg 240
agccgctgca gcgaaatggt gccgggcacc gcggattgcc atattaccgc ggatcgcaaa 300
gtgtatccgc agcggatat ggtgattgtg catcattggg atattatgag caaccgaaa 360
agccgcctgc cgccgagccc gcgcccgcag gcccagcgt ggatttggt taacctggaa 420
ccgcccgga actgccagca tctggaagcg ctggatogct attttaacct gaccatgagc 480
tatcgcagcg atagcgatat ttttaccocg tatggctggc tggaaccgtg gagcggccag 540
ccggcgcac cgcgctgaa cctgagcgcg aaaaccgaac tggcggcgtg ggcggtgagc 600
aactggaac cggatagcgc gcgcgtgcgc tattatcaga gcctgcaggc gcatctgaaa 660

10

ES 2 691 619 T3

gtggatgtgt atggccgcag ccataaacg ctgccgaaag gcacatgat ggaaccctg 720
 agccgctata aatattatct ggcgtttgaa aacagcctgc atccggatta tattaccgaa 780
 aaactgtggc gcaacgcgct ggaagcgtgg gcggtgccgg tgggtgctggg cccgagccgc 840
 agcaactatg aacgctttct gccgccggat gcgtttattc atgtggatga ttttcagagc 900
 ccgaaagatc tggcgcgcta tctgcaggaa ctggataaag atcatgcgcg ctatctgagc 960
 tattttcgct ggcgcgaaac cctgcgcccg cgcagcttta gctgggcgct ggatttttgc 1020
 aaagcgtgct ggaactgca gcaggaaagc cgctatcaga ccgtgcgcag cattgcggcg 1080
 tggtttacct aagcggccgc 1100

<210> 7
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 7
 Met Ala Ser Lys Val Ser Cys Leu Tyr Val Leu Thr Val Val Cys Trp
 1 5 10 15
 Ala Ser Ala Leu Trp Tyr Leu Ser Ile Thr Arg Pro Thr Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Gly Ser Lys Pro Phe Ser His Leu Thr Val Ala Arg Lys Asn Phe
 35 40 45
 Thr Phe Gly Asn Ile Arg Thr Arg Pro Ile Asn Pro His Ser Phe Glu
 50 55 60
 Phe Leu Ile Asn Glu Pro Asn Lys Cys Glu Lys Asn Ile Pro Phe Leu
 65 70 75 80
 Val Ile Leu Ile Ser Thr Thr His Lys Glu Phe Asp Ala Arg Gln Ala
 85 90 95
 Ile Arg Glu Thr Trp Gly Asp Glu Asn Asn Phe Lys Gly Ile Lys Ile
 100 105 110
 Ala Thr Leu Phe Leu Leu Gly Lys Asn Ala Asp Pro Val Leu Asn Gln
 115 120 125
 Met Val Glu Gln Glu Ser Gln Ile Phe His Asp Ile Ile Val Glu Asp
 130 135 140
 Phe Ile Asp Ser Tyr His Asn Leu Thr Leu Lys Thr Leu Met Gly Met
 145 150 155 160

10

ES 2 691 619 T3

Arg Trp Val Ala Thr Phe Cys Ser Lys Ala Lys Tyr Val Met Lys Thr
 165 170 175

Asp Ser Asp Ile Phe Val Asn Met Asp Asn Leu Ile Tyr Lys Leu Leu
 180 185 190

Lys Pro Ser Thr Lys Pro Arg Arg Arg Tyr Phe Thr Gly Tyr Val Ile
 195 200 205

Asn Gly Gly Pro Ile Arg Asp Val Arg Ser Lys Trp Tyr Met Pro Arg
 210 215 220

Asp Leu Tyr Pro Asp Ser Asn Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Tyr Ile Phe Ser Ala Asp Val Ala Glu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Leu
 245 250 255

His Thr Arg Leu Leu His Leu Glu Asp Val Tyr Val Gly Leu Cys Leu
 260 265 270

Arg Lys Leu Gly Ile His Pro Phe Gln Asn Ser Gly Phe Asn His Trp
 275 280 285

Lys Met Ala Tyr Ser Leu Cys Arg Tyr Arg Arg Val Ile Thr Val His
 290 295 300

Gln Ile Ser Pro Glu Glu Met His Arg Ile Trp Asn Asp Met Ser Ser
 305 310 315 320

Lys Lys His Leu Arg Cys
 325

<210> 8
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> humano

<400> 8
 cccccgctag catggccagc aaggtagct gcctgtacgt gctgaccgtg gtgtgctggg 60
 ccagcgcctt gtggtacctg agcatcacca gaccaccag cagctacacc ggcagcaagc 120
 ccttcagcca cctgaccgtg gccagaaaga acttcacctt cggcaacatc agaaccagac 180
 ccatcaacc ccacagcttc gagttcctga tcaacgagcc caacaagtgc gagaagaaca 240
 tccccttctt ggtgatcctg atcagcacca cccacaagga gttcgacgcc agacaggcca 300
 tcagagagac ctggggcgac gagaacaact tcaagggcat caagatgcc accctgttcc 360

5

10

ES 2 691 619 T3

tgctgggcaa gaacgccgac cccgtgctga accagatggt ggagcaggag agccagatct 420
 tccacgacat catcgtggag gacttcatcg acagctacca caacctgacc ctgaagaccc 480
 tgatgggcat gagatgggtg gccaccttct gcagcaaggc caagtacgtg atgaagaccg 540
 acagcgacat cttcgtgaac atggacaacc tgatctacaa gctgctgaag cccagcacca 600
 agcccagaag aagatacttc accggctacg tgatcaacgg cggccccatc agagacgtga 660
 gaagcaagtg gtacatgccc agagacctgt accccgacag caactacccc cccttctgca 720
 gcggcaccgg ctacatcttc agcgcgcgacg tggccgagct gatctacaag accagcctgc 780
 acaccagact gctgcacctg gaggacgtgt acgtgggcct gtgcctgaga aagctgggca 840
 tccaccctt ccagaacagc ggcttcaacc actggaagat ggctacagc ctgtgcagat 900
 acagaagagt gatcaccgtg caccagatca gccccgagga gatgcacaga atctggaacg 960
 acatgagcag caagaagcac ctgagatgct gagcggccgc ccccc 1005

<210> 9
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 9
 Met Ala His Met Lys Thr Arg Leu Val Tyr Ala Ser Ile Leu Met Met
 1 5 10 15

 Gly Ala Leu Cys Leu Tyr Phe Ser Met Asp Ser Phe Arg Glu Leu Pro
 20 25 30

 Phe Val Phe Lys Lys Ser His Gly Lys Phe Leu Gln Ile Pro Asp Ile
 35 40 45

 Asp Cys Lys Gln Lys Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr Ser Ser
 50 55 60

 His Lys Gln Leu Ala Ala Arg Met Ala Ile Arg Lys Thr Trp Gly Arg
 65 70 75 80

 Glu Thr Ser Val Gln Gly Gln Gln Val Arg Thr Phe Phe Leu Leu Gly
 85 90 95

 Thr Ser Asp Ser Thr Glu Glu Met Asp Ala Thr Thr Leu Glu Ser Glu
 100 105 110

 Gln His Arg Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Lys Asp Ala Tyr Phe Asn
 115 120 125

10

ES 2 691 619 T3

Leu Thr Leu Lys Thr Met Met Gly Met Glu Trp Val Tyr His Phe Cys
 130 135 140

Pro Gln Thr Ala Tyr Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe Val Asn
 145 150 155 160

Val Gly Tyr Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Lys Thr Thr Arg
 165 170 175

Phe Phe Thr Gly Tyr Ile Lys Pro His Asp Phe Pro Ile Arg Gln Lys
 180 185 190

Phe Asn Lys Trp Phe Val Ser Lys Phe Glu Tyr Pro Trp Asp Arg Tyr
 195 200 205

Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Ser Asp Val Ala
 210 215 220

Ile Gln Val Tyr Asn Val Ser Glu Ser Val Pro Phe Ile Lys Leu Glu
 225 230 235 240

Asp Val Phe Val Gly Leu Cys Leu Ala Lys Leu Lys Ile Arg Pro Glu
 245 250 255

Glu Leu His Thr Lys Gln Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg Phe Ser
 260 265 270

Val Cys Arg Phe Gln Lys Ile Val Ala Cys His Phe Met Lys Pro Gln
 275 280 285

Asp Leu Leu Thr Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Lys Glu Gln Asp
 290 295 300

Cys Pro Ala Val
 305

<210> 10

<211> 951

5 <212> ADN

<213> humano

<400> 10

cccccgctag catggcccac atgaagacca gactggtgta cgccagcatc ctgatgatgg 60

gcgccctgtg cctgtacttc agcatggaca gcttcagaga gctgcccttc gtgttcaaga 120

agagccacgg caagttcctg cagatccccg acatcgactg caagcagaag ccccccttcc 180

tggtgctgct ggtgaccagc agccacaagc agctggccgc cagaatggcc atcagaaaga 240

cctggggcag agagaccagc gtgcagggcc agcaggtgag aaccttcttc ctgctgggca 300

10

ES 2 691 619 T3

ccagcgacag caccgaggag atggacgcca ccaccctgga gagcgagcag cacagagaca 360
 tcatccagaa ggacttcaag gacgcctact tcaacctgac cctgaagacc atgatgggca 420
 tggagtgggt gtaccacttc tgccccaga ccgcctacgt gatgaagacc gacagcgaca 480
 tgttcgtgaa cgtgggctac ctgaccgagc tgctgctgaa gaagaacaag accaccagat 540
 tcttcaccgg ctacatcaag ccccacgact tccccatcag acagaagttc aacaagtgg 600
 tcgtgagcaa gttcgagtac ccctgggaca gatacccccc cttctgcagc ggcaccggct 660
 acgtgttcag cagcgacgtg gccatccagg tgtacaacgt gagcgagagc gtgcccttca 720
 tcaagctgga ggacgtgttc gtgggcctgt gcctggccaa gctgaagatc agaccggagg 780
 agctgcacac caagcagacc ttcttccccg gcggcctgag attcagcgtg tgcagattcc 840
 agaagatcgt ggcctgccac ttcatgaagc cccaggacct gctgacctac tggcaggccc 900
 tggagaacag caaggagcag gactgccccg ccgtgtgagc ggccgcccc c 951

<210> 11
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 11
 Met Ser Val Gly Arg Arg Arg Val Lys Leu Leu Gly Ile Leu Met Met
 1 5 10 15

 Ala Asn Val Phe Ile Tyr Leu Ile Val Glu Val Ser Lys Asn Ser Ser
 20 25 30

 Gln Asp Lys Asn Gly Lys Gly Gly Val Ile Ile Pro Lys Glu Lys Phe
 35 40 45

 Trp Lys Pro Pro Ser Thr Pro Arg Ala Tyr Trp Asn Arg Glu Gln Glu
 50 55 60

 Lys Leu Asn Arg Trp Tyr Asn Pro Ile Leu Asn Arg Val Ala Asn Gln
 65 70 75 80

 Thr Gly Glu Leu Ala Thr Ser Pro Asn Thr Ser His Leu Ser Tyr Cys
 85 90 95

 Glu Pro Asp Ser Thr Val Met Thr Ala Val Thr Asp Phe Asn Asn Leu
 100 105 110

 Pro Asp Arg Phe Lys Asp Phe Leu Leu Tyr Leu Arg Cys Arg Asn Tyr
 115 120 125

10

ES 2 691 619 T3

Ser Leu Leu Ile Asp Gln Pro Lys Lys Cys Ala Lys Lys Pro Phe Leu
 130 135 140

Leu Leu Ala Ile Lys Ser Leu Ile Pro His Phe Ala Arg Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Ile Arg Glu Ser Trp Gly Arg Glu Thr Asn Val Gly Asn Gln Thr Val
 165 170 175

Val Arg Val Phe Leu Leu Gly Lys Thr Pro Pro Glu Asp Asn His Pro
 180 185 190

Asp Leu Ser Asp Met Leu Lys Phe Glu Ser Asp Lys His Gln Asp Ile
 195 200 205

Leu Met Trp Asn Tyr Arg Asp Thr Phe Phe Asn Leu Ser Leu Lys Glu
 210 215 220

Val Leu Phe Leu Arg Trp Val Ser Thr Ser Cys Pro Asp Ala Glu Phe
 225 230 235 240

Val Phe Lys Gly Asp Asp Asp Val Phe Val Asn Thr His His Ile Leu
 245 250 255

Asn Tyr Leu Asn Ser Leu Ser Lys Ser Lys Ala Lys Asp Leu Phe Ile
 260 265 270

Gly Asp Val Ile His Asn Ala Gly Pro His Arg Asp Lys Lys Leu Lys
 275 280 285

Tyr Tyr Ile Pro Glu Val Phe Tyr Thr Gly Val Tyr Pro Pro Tyr Ala
 290 295 300

Gly Gly Gly Gly Phe Leu Tyr Ser Gly Pro Leu Ala Leu Arg Leu Tyr
 305 310 315 320

Ser Ala Thr Ser Arg Val His Leu Tyr Pro Ile Asp Asp Val Tyr Thr
 325 330 335

Gly Met Cys Leu Gln Lys Leu Gly Leu Val Pro Glu Lys His Lys Gly
 340 345 350

Phe Arg Thr Phe Asp Ile Glu Glu Lys Asn Lys Lys Asn Ile Cys Ser
 355 360 365

Tyr Ile Asp Leu Met Leu Val His Ser Arg Lys Pro Gln Glu Met Ile
 370 375 380

Asp Ile Trp Ser Gln Leu Gln Ser Pro Asn Leu Lys Cys
 385 390 395

5 <210> 12
 <211> 1218
 <212> ADN
 <213> humano

10 <400> 12

ES 2 691 619 T3

cccccgctag catgagcgtg ggcagaagaa gagtgaagct gctgggcatc ctgatgatgg 60
 ccaacgtggt catctacctg atcgtggagg tgagcaagaa cagcagccag gacaagaacg 120
 gcaagggcgg cgtgatcatc cccaaggaga agttctggaa gccccccagc acccccagag 180
 cctactggaa cagagagcag gagaagctga acagatggta caaccccatc ctgaacagag 240
 tggccaacca gaccggcgag ctggccacca gcccacaacac cagccacctg agctactgcg 300
 agcccgacag caccgtgatg accgccgtga ccgacttcaa caacctgccc gacagattca 360
 aggacttctt gctgtacctg agatgcagaa actacagcct gctgatcgac cagcccaaga 420
 agtgcgcaaa gaagcccttc ctgctgctgg ccatcaagag cctgatcccc cacttcgcca 480
 gaagacaggg catcagagag agctggggca gagagaccaa cgtgggcaac cagaccgtgg 540
 tgagagtgtt cctgctgggc aagaccccc ccgaggacaa ccaccccgac ctgagcgaca 600
 tgctgaagtt cgagagcgac aagcaccagg acatcctgat gtggaactac agagacacct 660
 tcttcaacct gagcctgaag gaggtgctgt tcctgagatg ggtgagcacc agctgccccg 720
 acgccgagtt cgtgttcaag ggcgacgacg acgtgttcgt gaacaccac cacatcctga 780
 actacctgaa cagcctgagc aagagcaagg ccaaggacct gttcatcggc gacgtgatcc 840
 acaacgccgg cccccacaga gacaagaagc tgaagtacta catccccgag gtgttctaca 900
 ccggcgtgta cccccctac gccggcggcg gcggcttctt gtacagcggc cccttgcccc 960
 tgagactgta cagcgccacc agcagagtgc acctgtacct catcgacgac gtgtacaccg 1020
 gcatgtgctt gcagaagctg ggcctggtgc ccgagaagca caagggcttc agaaccttgc 1080
 acatcgagga gaagaacaag aagaacatct gcagctacat cgacctgatg ctggtgcaca 1140
 gcagaaagcc ccaggagatg atcgacatct ggagccagct gcagagcccc aacctgaagt 1200
 gctgagcggc cgcccccc 1218

<210> 13
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> proteína quimérica

10

<400> 13

ES 2 691 619 T3

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

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

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

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

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

Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Pro Thr Ser
130 135 140

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

Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln Glu Pro Leu
165 170 175

Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val Thr Ala Arg Asn Phe
180 185 190

Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr Ser Ser Gln
195 200 205

Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly Lys Ser Val Thr Cys
210 215 220

His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr Val Pro Cys
225 230 235 240

Pro Val Pro Pro Pro Pro Pro Cys Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His
245 250 255

ES 2 691 619 T3

Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr
 260 265 270

Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Ala Thr Phe Thr Trp
 275 280 285

Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp
 290 295 300

Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Gln
 305 310 315 320

Pro Trp Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala His Pro Glu
 325 330 335

Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys Ser Gly Asn Thr Phe
 340 345 350

Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu
 355 360 365

Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys
 370 375 380

Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr
 405 410 415

Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys
 420 425 430

Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu
 435 440 445

Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro Thr His
 450 455 460

Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys Tyr
 465 470 475

<210> 14
 <211> 1460
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 10 <223> ADN quimérico

<400> 14

ES 2 691 619 T3

```

ccccaaagctt atgggctgga gctggatctt cctgttctcg ctgagcggca ccgccggcgt      60
gctgagccag gtgcagctgc agcagcccgg cgccgagctg gtgaagcccg gcgccagcgt      120
gaagctgagc tgcaaggcca gggctacac cttcaccagc tactggatgc actgggtgaa      180
gcagagaccc ggcagaggcc tggagtggat cggcagaatc gacccaaca gcggcggcac      240
caagtacaac gagaagttca agagcaaggc caccctgacc gtggacaagc ccagcagcac      300
cgcctacatg cagctgagca gcctgaccag cgaggacagc gccgtgtact actgcgccag      360
atacgactac tacggcagca gctacttcca ctactggggc cagggcacca ccgtgaccgt      420
gagcagcgcc agccccacca gcccgaaggt gttccccctg agcctggaca gcacccccca      480
ggacggcaac gtggtggtgg cctgcctggt gcagggcttc ttccccagg agcccctgag      540
cgtgacctgg agcagagcgg gccagaacgt gaccgccaga aacttcccc ccagccagga      600
cgccagcggc gacctgtaca ccaccagcag ccagctgacc ctgcccgcca cccagtgcc      660
cgacggcaag agcgtgacct gccacgtgaa gactacacc aaccccagcc aggacgtgac      720
cgtgccctgc cccgtgcccc ccccccccc ctgctgccac cccagactga gcctgcacag      780
acccgccctg gaggacctgc tgctgggcag cgaggccaac ctgacctgca ccctgaccgg      840
cctgagagac gccagcggcg ccacctcac ctggaccccc agcagcggca agagcgcctg      900
gcagggcccc cccgagagag acctgtgcgg ctgctacagc gtgagcagcg tgctgcccg      960
ctgcccag ccctggaacc acggcgagac cttcacctgc accgccgcc accccgagct     1020
gaagaccccc ctgaccgcca acatcaccaa gagcggcaac accttcagac ccgaggtgca     1080
cctgctgcc cccccagcg aggagctggc cctgaacgag ctggtgacct tgacctgct      1140
ggccagaggc ttcagcccca aggacgtgct ggtgagatgg ctgcagggca gccaggagct     1200
gccagagag aagtacctga cctgggccag cagacaggag cccagccagg gcaccaccac     1260
cttcgccgtg accagcatcc tgagagtggc cgccgaggac tgaagaagg gcgacacctt     1320
cagctgcatg gtgggccacg aggccctgcc cctggccttc acccagaaga ccatcgacag     1380
actggccggc aagcccacc acgtgaacgt gagcgtggtg atggccgagg tggacggcac     1440
ctgctactga tctagacccc                                         1460

```

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

5

<220>
 <223> Motivo de secuencia

10

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X es cualquier aminoácido excepto Prolina

15

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido excepto Prolina

20

ES 2 691 619 T3

<400> 15
Asn Xaa Thr Xaa
 1

5 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Motivo de secuencia

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (2)..(2)
 <223> X es cualquier aminoácido excepto Prolina

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido excepto Prolina

25 <400> 16
Asn Xaa Ser Xaa
 1

30 <210> 17
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> goat

<400> 17
Met Ser Arg Leu Phe Leu Ala Cys Leu Leu Ala Val Phe Pro Val Val
 1 5 10 15

Ser Met Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Lys Glu Val Thr Ser Val Glu
 20 25 30

Gly Arg Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Ala Thr Ser Val Asn
 35 40 45

Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Thr Gly Arg Cys
 50 55 60

35

ES 2 691 619 T3

Thr Thr Leu Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Asp Asp Tyr Val Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu Ser Gly Thr Phe Val Val Asp
 85 90 95
 Ile Ser His Leu Thr Arg Asn Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu
 100 105 110
 Gly Ile Ser Ser Arg Gly Leu Asn Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser
 115 120 125
 Gln Asp Pro Ala Gln Ala Ser Asp Ala His Ile Tyr Pro Val Asp Val
 130 135 140
 Gly Arg Thr Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Thr Ser Ala Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Lys Arg Lys Ser Leu Cys Lys Lys Thr Gly Gln Gly Cys Phe Leu Ile
 165 170 175
 Ile Asp Ser Thr Gly Tyr Lys Asn Glu Asn Tyr Glu Asp Arg Ile Arg
 180 185 190
 Leu Asn Ile Ala Gly Thr Asp Thr Leu Val Phe Ser Val Val Ile Asn
 195 200 205
 Arg Val Leu Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Gln Ala Gly Asp
 210 215 220
 Asp Ala Lys Ala Asp Lys Ser Asn Val Tyr Leu Gln Val Leu Glu Pro
 225 230 235 240
 Glu Pro Glu Leu Val Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Ser Val Thr Phe Asp
 245 250 255
 Cys Ser Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Thr Ala Lys Phe Leu Cys Gln
 260 265 270
 Gln Lys Asn Gly Glu Ala Cys Asn Val Val Ile Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285
 Lys Ala Gln Asp Phe Gln Gly Arg Ile Leu Phe Leu Pro Lys Asp Asn
 290 295 300
 Gly Val Phe Ser Val His Ile Ala Ser Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly

ES 2 691 619 T3

Val Glu Ser Arg Ala Lys Gly Ser Gln Asp Ala Lys Gln Val Asn Ala
 565 570 575

Ala Pro Ala Gly Gly Ala Ile Glu Ser Arg Ala Gly Glu Ile Gln Asn
 580 585 590

Lys Ala Leu Leu Asp Pro Arg Leu Phe Val Glu Glu Ile Ala Val Lys
 595 600 605

Asp Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Pro Ala Asp Pro Gly Arg Pro Ala
 610 615 620

Gly His Ser Gly Ser Ser Lys
 625 630

5 <210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> péptido

<400> 18
 Ala Asn Leu Thr Asn Phe Pro Glu
 1 5

15 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <220>
 <223> péptido

25 <400> 19
 Asn Asp Ser Gly Arg
 1 5

30 <210> 20
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> artificial

35 <220>
 <223> péptido

<400> 20
 Leu Ala Leu Leu Ala Gln Pro Gly Asn Gly Thr Tyr Thr Val Ile Leu
 1 5 10 15

Asn Gln Leu Thr Asp Gln Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Val Thr Asp
 20 25 30

40 Gly Asp Thr Ser Trp Thr Ser Thr Val Gln Leu Lys
 35 40
 <210> 21

ES 2 691 619 T3

<211> 8
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> péptido

<400> 21

10 Asn Val Thr Ala Trp Leu Gly Glu
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un componente secretor humano recombinante aislado (SC) caracterizado por al menos 2 moles de fucosa no central por mol de SC, expresando el SC de una línea celular hospedante de producción recombinante que expresa una alfa-1,x-fucosiltransferasa funcional heteróloga, en donde x es 2, 3 o 4.
- 5 2. El método de la reivindicación 1, en donde la línea celular hospedante de producción es una línea de células CHO.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde se obtiene una preparación de SC en donde al menos el 90% de las moléculas de SC tienen el mismo extremo C.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el SC comprende la secuencia de aminoácidos de SC humano como se proporciona en la SEQ ID 1, o uno de sus fragmentos con un extremo C después del aminoácido G545 de la SEQ ID 1, o una de sus variantes funcionalmente activas que es capaz de unirse a los dímeros de IgA para formar un inmunocomplejo secretor.
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el SC se expresa a partir de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SC humano como se proporciona en la SEQ ID 1, o uno de sus fragmentos con un codón de terminación respectivo para obtener un extremo C después del aminoácido G545 de la SEQ ID 1.
6. Un método para preparar una preparación de inmunocomplejo que comprende producir el SC de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y combinar dicho SC con una inmunoglobulina polimérica.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicha inmunoglobulina polimérica es IgA dimérica.
- 20 8. El método de la reivindicación 7, en donde la IgA es IgA humana.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además producir una formulación en forma de un líquido, emulsión o suspensión o en forma seca.

Fig. 1

MLLFVLTCLLAVFPAISTKSPIFGPEEVNSVEGNSVSITCYYPPTSVNRHTRKYWCRQG
ARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTNFPENGTFFVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSR
GLSFDVSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGRTVTINCPFKTENAQKRKSLYKQIGLYPVLV
IDSSGYVNPNYTGRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCQAGDDSNSNKKNAD
LQVLKPEPELVYEDLRGSVTFHCALGPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAP
AFEGRILLNPQDKDGSFSVITGLRKEDAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNE
ESTIPRSPTVVKGVAGSSVAVLCPYNRKEKSIKYWCLWEGAQNGRCPLLVDSEGWV
KAQYEGRLSLLLEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCLTNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNL
KVPGNVTAVLGETLKVPCHFPCFKFSSYEKYWCKWNNTGCQALPSQDEGPSKAFVNC
DENSRLVSLTLNLVTRADEGWYWCGVKQGHFYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSLA
KADAAPDEKVLDSGFREIENKAIQDPRLFAE (Seq. ID. No. 1)

Fig. 2

CCCCAAGCTTATGCTGCTGTTTCGTGCTGACCTGCCTGCTGGCCGTGTTCCCCGC
 CATCAGCACCAAGAGCCCCATCTTCGGCCCCGAGGAGGTGAACAGCGTGGAGGG
 CAACAGCGTGAGCATCACCTGCTACTACCCCCACCAGCGTGAACAGACACACC
 AGAAAGTACTGGTGCAGACAGGGCGCCAGAGGGCGGCTGCATCACCTGATCAGC
 AGCGAGGGCTACGTGAGCAGCAAGTACGCCGGCAGAGCCAACCTGACCAACTTC
 CCCGAGAACGGCACCTTCGTGGTGAACATCGCCCAGCTGAGCCAGGACGACAGC
 GGCAGATAACAAGTGCGGCCTGGGCATCAACAGCAGAGGCCTGAGCTTCGACGTG
 AGCCTGGAGGTGAGCCAGGGCCCCGGCCTGCTGAACGACACCAAGGTGTACAC
 CGTGGACCTGGGCAGAACCGTGACCATCAACTGCCCTTCAAGACCGAGAACGC
 CCAGAAGAGAAAGAGCCTGTACAAGCAGATCGGCCTGTACCCCGTGCTGGTGATC
 GACAGCAGCGGCTACGTGAACCCCAACTACACCGGCAGAATCAGACTGGACATC
 CAGGGCACCGGCCAGCTGCTGTTTCAGCGTGGTGATCAACCAGCTGAGACTGAGC
 GACGCCGGCCAGTACCTGTGCCAGGCGCGGCAGCAGCAACAGCAACAAGAA
 GAACGCCGACCTGCAGGTGCTGAAGCCCGAGCCCGAGCTGGTGTACGAGGACC
 TGAGAGGCAGCGTGACCTTCCACTGCGCCCTGGGCCCCGAGGTGGCCAACGTG
 GCCAAGTTCCTGTGCAGACAGAGCAGCGGCGGAGAACTGCGACGTGGTGGTGAA
 CACCCTGGGCAAGAGAGCCCCCGCCTTCGAGGGCAGAATCCTGCTGAACCCCCA
 GGACAAGGACGGCAGCTTCAGCGTGGTGATCACCGGCCTGAGAAAGGAGGACG
 CCGGCAGATACCTGTGCGGGCGCCACAGCGACGGCCAGCTGCAGGAGGGCAGC
 CCCATCCAGGCCTGGCAGCTGTTTCGTGAACGAGGAGAGCACCATCCCAGAAGC
 CCCACCGTGGTGAAGGGCGTGGCCGGCAGCAGCGTGGCCGTGCTGTGCCCTA
 CAACAGAAAGGAGAGCAAGAGCATCAAGTACTGGTGCCTGTGGGAGGGCGCCCA
 GAACGGCAGATGCCCCCTGCTGGTGGACAGCGAGGGCTGGGTGAAGGCCCAGT
 ACGAGGGCAGACTGAGCCTGCTGGAGGAGCCCGGCAACGGCACCTTCACCGTG
 ATCCTGAACCAGCTGACCAGCAGAGACGCCGGCTTCTACTGGTGCCTGACCAAC
 GGCGACACCCTGTGGAGAACCACCGTGGAGATCAAGATCATCGAGGGCGAGCCC
 AACCTGAAGGTGCCCCGGCAACGTGACCGCCGTGCTGGGCGAGACCCTGAAGGT
 GCCCTGCCACTTCCCCTGCAAGTTCAGCAGCTACGAGAAGTACTGGTGAAGTG
 GAACAACACCGGCTGCCAGGCCCTGCCAGCCAGGACGAGGGCCCCAGCAAGG
 CCTTCGTGAACTGCGACGAGAACAGCAGACTGGTGAGCCTGACCCTGAACCTGG
 TGACCAGAGCCGACGAGGGCTGGTACTGGTGCGGCGTGAAGCAGGGCCACTTCT
 ACGGCGAGACCGCCGCCGTGTACGTGGCCGTGGAGGAGAGAAAGGCCCGCCGGC
 AGCAGAGACGTGAGCCTGGCCAAGGCCGACGCCGCCCCCGACGAGAAGGTGCT
 GGACAGCGGCTTCAGAGAGATCGAGAACAAGGCCATCCAGGACCCCAGACTGTT
 CGCCGAGTGATCTAGACCCC (Seq. ID. No. 2)

Fig. 3

MLVVQMPFSFPMAHFILFVFTVSTIFHVQQRLAKIQAMWELPVQIPVLASTSKALGPSQ
LRGMWTINAIGRLGNQMGEYATLYALAKMNGRPAFIPAQMNSTLAPIFRITLPVLHSAT
ASRIPWQNYHLNDWMEEYRHRIPGEYVRFYGYPCSWTFYHHLRQEILQEFTLHDHVR
EEAQKFLRGLQVNGSRPGTFVGVHVRGDIYVHVMPKVWKGVVADRRYLQQALDWF
RARYSSLIFVVTNSGMAWCRENIDTSHGDVVFAGDGI EGSPAKDFALLTQC�HTIMTIG
TFGIWAAYLTGGDTIYLANYTLPDSPFLKIFKPEAAFLPEWTGIAADLSPLLKH (Seq. ID.
No. 3)

Fig. 4

GCTAGCATGCTGGTGGTGCAGATGCCGTTTAGCTTTCCGATGGCGCATTTTTATTCT
GTTTGTGTTTACCGTGAGCACCATTTTTTCATGTGCAGCAGCGCCTGGCGAAAATTC
AGGCGATGTGGGAACTGCCGGTGCAGATTCCGGTGCTGGCGAGCACCAAG
CGCTGGGCCCCGAGCCAGCTGCGCGGCATGTGGACCATTAACGCGATTGGCCGCC
TGGGCAACCAGATGGGCGAATATGCGACCCTGTATGCGCTGGCGAAAATGAACGG
CCGCCCGGCGTTTATTCCGGCGCAGATGCATAGCACCCCTGGCGCCGATTTTTCGC
ATTACCCTGCCGGTGTGCATAGCGCGACCCGCGAGCCGCATTCCGTGGCAGAACT
ATCATCTGAACGATTGGATGGAAGAAGAATATCGCCATATTCCGGGCGAATATGTGC
GCTTTACCGGCTATCCGTGCAGCTGGACCTTTTATCATCATCTGCGCCAGGAAATT
CTGCAGGAATTTACCCTGCATGATCATGTGCGCGAAGAAGCGCAGAAATTTCTGC
GCGGCCTGCAGGTGAACGGCAGCCGCCCGGGCACCTTTGTGGGCGTGCATGTG
CGCCGCGGCGATTATGTGCATGTGATGCCGAAAGTGTGGAAAGGCGTGGTGGCG
GATCGCCGCTATCTGCAGCAGGCGCTGGATTGGTTTCGCGCGCGCTATAGCAGCC
TGATTTTTGTGGTGACCAGCAACGGCATGGCGTGGTGCCGCGAAAACATTGATAC
CAGCCATGGCGATGTGGTGTTCGCGGCGATGGCATTGAAGGCAGCCCGGCGAA
AGATTTTGCCTGCTGACCCAGTGCAACCATAACCATTATGACCATTGGCACCTTTG
GCATTTGGGCGGCGTATCTGACCGGCGGCGATACCATTATCTGGCGAACTATACC
CTGCCGGATAGCCCGTTTCTGAAAATTTTTAAACCGGAAGCGGCGTTTCTGCCGG
AATGGACCGGCATTGCGGCGGATCTGAGCCCGCTGCTGAAACATTAAGAAATTC
(Seq. ID. No. 4)

Fig. 5

MDPLGAAKPQWPWRRSLAALLFQLLVAVCFFSYLRVSRDDATGSPRAPSGSSRQDT
 TPTRPTLLILLRTWPFHIPVALSRCSEMVPGTADCHITADRKVYPQADMVIVHHWDIMS
 NPKSRLPPSPRPQGQRWIWFNLEPPPNCQHLEALDRYFNLTMSYRSDSDIFTPYGW
 LEPWSGQPAHPPLNLSAKTELVAWAVSNWKPDSARVRYQSLQAHLKVDVYGRSHK
 PLPKGTMMETLSRYKFYLAFENSLHPDYITEKLWRNALEAWAVPVVLGPSRSNYERFL
 PPDAFIHVDDFQSPKDLARYLQELDKDHARYLSYFRWRETLRPRSFSWALDFCKAC
 WKLQQESRYQTVRSIAAWFT (Seq. ID. No.5)

Fig. 6

TCTAGAATGGATCCGCTGGGCGCGGCGAAACCGCAGTGGCCGTGGCGCCGCAG
 CCTGGCGGGCGCTGCTGTTTCAGCTGCTGGTGGCGGTGTGCTTTTTTAGCTATCTG
 CGCGTGAGCCGCGATGATGCGACCGGCAGCCCGCGCGCGCCGAGCGGCAGCA
 GCCGCCAGGATACCACCCCGACCCGCCCGACCCTGCTGATTCTGCTGCGCACCT
 GGCCGTTTCATATTCCGGTGGCGCTGAGCCGCTGCAGCGAAATGGTGCCGGGCA
 CCGCGGATTGCCATATTACCGCGGATCGCAAAGTGTATCCGCAGGCGGATATGGT
 GATTGTGCATCATTGGGATATTATGAGCAACCCGAAAAGCCGCCTGCCGCCGAGC
 CCGCGCCCGCAGGGCCAGCGCTGGATTTGGTTTAACTGGAACCGCCGCCGAAC
 TGCCAGCATCTGGAAGCGCTGGATCGCTATTTTAACTGACCATGAGCTATCGCAG
 CGATAGCGATATTTTTACCCCGTATGGCTGGCTGGAACCGTGGAGCGGCCAGCCG
 GCGCATCCGCCGCTGAACCTGAGCGCGAAAACCGAACTGGTGGCGTGGGCGGT
 GAGCAACTGGAAACCGGATAGCGCGCGCGTGCCTATTATCAGAGCCTGCAGGC
 GCATCTGAAAGTGGATGTGTATGGCCGCAGCCATAAACCGCTGCCGAAAGGCACC
 ATGATGGAAACCCTGAGCCGCTATAAATTTTATCTGGCGTTTGAAAACAGCCTGCAT
 CCGGATTATATTACCGAAAACTGTGGCGCAACGCGCTGGAAGCGTGGGCGGTG
 CCGGTGGTGTGCTGGGCCCGAGCCGCAGCAACTATGAACGCTTTCTGCCGCCGGAT
 GCGTTTATTCATGTGGATGATTTTCAGAGCCCGAAAGATCTGGCGCGCTATCTGCA
 GAACTGGATAAAGATCATGCGCGCTATCTGAGCTATTTTCGCTGGCGCGAAACCC
 TGCGCCCGCGCAGCTTTAGCTGGGCGCTGGATTTTGGCAAAGCGTGTGGAAAC
 TGCAGCAGGAAAGCCGCTATCAGACCGTGCAGCATTGCGGCGTGGTTTACCTA
AGCGGCCGC (Seq. ID. No. 6)

Fig. 7

MASKVSCLYVLTVVCWASALWYLSITRPTSSYTGSKPFSHLTVARKNFTFGNIRTRPIN
PHSFEFLINEPNKCEKNIPFLVILISTTHKEFDARQAIRETWGDENNFKGIKIATLFLLGK
NADPVLNQMVESQIFHDIIVEDFIDSYHNLTLLKTLMGMRWVATFCSKAKYVMKTDS
DIFVNMDNLIYKLLKPSTKPRRRYFTGYVINGGPIRDVRSKWYMPRDLYPDSNYPPFC
SGTGYIFSADVAELIYKTSLHTRLLHLEDVYVGLCLRKLGHPFQNSGFNHWKMAYSLC
RYRRVITVHQISPEEMHRIWNDMSSKKHLRC (Seq. ID. No. 7)

Fig. 8

CCCCCGCTAGCATGGCCAGCAAGGTGAGCTGCCTGTACGTGCTGACCGTGGTGT
GCTGGGCCAGCGCCCTGTGGTACCTGAGCATCACCAGACCCACCAGCAGCTACA
CCGGCAGCAAGCCCTTCAGCCACCTGACCGTGGCCAGAAAGAACTTCACCTTCG
GCAACATCAGAACCAGACCCATCAACCCCCACAGCTTCGAGTTCCTGATCAACGA
GCCCAACAAGTGCGAGAAGAACATCCCCTTCCTGGTGATCCTGATCAGCACCACC
CACAAGGAGTTCGACGCCAGACAGGCCATCAGAGAGACCTGGGGCGACGAGAA
CAACTTCAAGGGCATCAAGATCGCCACCCTGTTCTGCTGGGCAAGAACGCCGA
CCCCGTGCTGAACCAGATGGTGGAGCAGGAGAGCCAGATCTTCCACGACATCATC
GTGGAGGACTTCATCGACAGCTACCACAACCTGACCCTGAAGACCCTGATGGGCA
TGAGATGGGTGGCCACCTTCTGCAGCAAGGCCAAGTACGTGATGAAGACCGACA
GCGACATCTTCGTGAACATGGACAACCTGATCTACAAGCTGCTGAAGCCCAGCAC
CAAGCCCAGAAGAAGATACTTCACCGGCTACGTGATCAACGGCGGCCCCATCAGA
GACGTGAGAAGCAAGTGGTACATGCCAGAGACCTGTACCCCGACAGCAACTACC
CCCCCTTCTGCAGCGGCACCGGCTACATCTTCAGCGCCGACGTGGCCGAGCTGA
TCTACAAGACCAGCCTGCACACCAGACTGCTGCACCTGGAGGACGTGTACGTGG
GCCTGTGCCTGAGAAAGCTGGGCATCCACCCCTTCCAGAACAGCGGCTTCAACC
ACTGGAAGATGGCCTACAGCCTGTGCAGATACAGAAGAGTGATCACCGTGCACCA
GATCAGCCCCGAGGAGATGCACAGAATCTGGAACGACATGAGCAGCAAGAAGCA
CCTGAGATGCTGAGGCGGCCGCCCCCC (Seq. ID. No. 8)

Fig. 9

MAHMKTRLVYASILMMGALCLYFSMDSFRELPFVFKKSHGKFLQIPDIDCKQKPPFLVL
LVTSSHKQLAARMAIRKTWGRETSVQQGQVVRTFFLLGTSDSTEEMDATTLESEQHRD
IIQKDFKDAYFNLTLLKTMGMMEWVYHFCPQTAYVMKTDSDMFVNVGYLTELKKNKT
TRFFTGYIKPHDFPIRQKFNKWFVSKFEYPWDRYPPFCSGTGYVVFSSDVAIQVYNVSE
SVPFIKLEDVFGVGLCLAKLIRPEELHTKQTFPPGGLRFSVCRFQKIVACHFMKPQDLL
TYWQALENSKEQDCPAV (Seq. ID. No. 9)

Fig. 10

CCCCGCTAGCATGGCCACATGAAGACCAGACTGGTGTACGCCAGCATCCTGAT
GATGGGCGCCCTGTGCCTGTACTTCAGCATGGACAGCTTCAGAGAGCTGCCCTTC
GTGTTCAAGAAGAGCCACGGCAAGTTCCTGCAGATCCCCGACATCGACTGCAAG
CAGAAGCCCCCTTCTGGTGTCTGGTGACCAGCAGCCACAAGCAGCTGGCC
GCCAGAATGGCCATCAGAAAGACCTGGGGCAGAGAGACCAGCGTGCAGGGCCA
GCAGGTGAGAACCTTCTTCTGCTGGGCACCAGCGACAGCACCGAGGAGATGGA
CGCCACCACCCTGGAGAGCGAGCAGCACAGAGACATCATCCAGAAGGACTTCAA
GGACGCCTACTTCAACCTGACCCTGAAGACCATGATGGGCATGGAGTGGGTGTAC
CACTTCTGCCCCAGACCCGCCTACGTGATGAAGACCGACAGCGACATGTTTCGTGA
ACGTGGGCTACCTGACCGAGCTGCTGCTGAAGAAGAACAAGACCACCAGATTCTT
CACCGGCTACATCAAGCCCCACGACTTCCCCATCAGACAGAAGTTCAACAAGTGG
TTCGTGAGCAAGTTCGAGTACCCCTGGGACAGATACCCCCCTTCTGCAGCGGCA
CCGGCTACGTGTTTCAGCAGCGACGTGGCCATCCAGGTGTACAACGTGAGCGAGA
GCGTGCCCTTCATCAAGCTGGAGGACGTGTTTCGTGGGCCTGTGCCTGGCCAAGC
TGAAGATCAGACCCGAGGAGCTGCACACCAAGCAGACCTTCTTCCCCGGCGGCC
TGAGATTCAGCGTGTGCAGATTCCAGAAGATCGTGGCCTGCCACTTCATGAAGCC
CCAGGACCTGCTGACCTACTGGCAGGCCCTGGAGAACAGCAAGGAGCAGGACTG
CCCCGCCGTGTGAGCGGGCCGCCCC (Seq. ID. No. 10)

Fig. 11

MSVGRRRVKLLGILMMANVFIYLIVEVSKNSSQDKNGKGGV IIPKEKFWKPPSTPRAY
WNREQEKLNRWYNPILNRVANQTGELATSPNTSHLSYCEPDSTVMTAVTDFNNLPDR
FKDFLLYLRCRNYSLLIDQPKKCAKPFLLLAIKSLIPHARRQAIRESWGRETNVGNQ
TVVRVFLLGKTPPEDNHPDLSDMLKFESDKHQDILMWNRYRDTFFNLSLKEVFLRWV
STSCPDAEFVFKGDDDFVNTHHILNYLNSLSKSKAKDLFIGDVIHNAGPHRDKLLKY
YIPEVFYTGVPYAGGGGFLYSGPLALRLYSATSRVHLYPIDDVYTGMC LQKLGVP
KHKGFRFTDIEKNKNKICSYIDLMLVHSRKPQEMIDIWSQLQSPNLKC (Seq. ID. No.
11)

Fig. 12

CCCCCGCTAGCATGAGCGTGGGCAGAAGAAGAGTGAAGCTGCTGGGCATCCTGA
 TGATGGCCAACGTGTTTCATCTACCTGATCGTGGAGGTGAGCAAGAACAGCAGCCA
 GGACAAGAACGGCAAGGGCGGCGTGATCATCCCCAAGGAGAAGTTCTGGAAGCC
 CCCAGCACCCCCAGAGCCTACTGGAACAGAGAGCAGGAGAAGCTGAACAGATG
 GTACAACCCCATCCTGAACAGAGTGGCCAACCAGACCCGGCGAGCTGGCCACCAG
 CCCCCAACACCAGCCACCTGAGCTACTGCGAGCCCCGACAGCACCGTGATGACCGC
 CGTGACCGACTTCAACAACCTGCCCGACAGATTCAAGGACTTCTGCTGTACCTG
 AGATGCAGAAACTACAGCCTGCTGATCGACCAGCCCCAAGAAGTGCGCCAAGAAG
 CCCTTCTGCTGCTGGCCATCAAGAGCCTGATCCCCACTTCGCCAGAAGACAG
 GCCATCAGAGAGAGCTGGGGCAGAGAGACCAACGTGGGCAACCAGACCGTGGT
 GAGAGTGTTCTGCTGGGCAAGACCCCCCCCCGAGGACAACCACCCCGACCTGAG
 CGACATGCTGAAGTTCGAGAGCGACAAGCACCAGGACATCCTGATGTGGA ACTAC
 AGAGACACCTTCTTCAACCTGAGCCTGAAGGAGGTGCTGTTCTGAGATGGGTGA
 GCACCAGCTGCCCGACGCCGAGTTCGTGTTCAAGGGCGACGACGACGTGTTCTG
 TGAACACCCACCACATCCTGAACTACCTGAACAGCCTGAGCAAGAGCAAGGCCAA
 GGACCTGTTTCATCGGCGACGTGATCCACAACGCCGGCCCCCACAGAGACAAGAA
 GCTGAAGTACTACATCCCCGAGGTGTTCTACACCGGCGTGTACCCCCCTACGCC
 GGCGGCGGCGGCTTCTGTACAGCGGCCCCCTGGCCCTGAGACTGTACAGCGC
 CACCAGCAGAGTGCACCTGTACCCCATCGACGACGTGTACACCGGCATGTGCCT
 GCAGAAGCTGGGCCTGGTGCCCGAGAAGCACAAGGGCTTCAGAACCTTCGACAT
 CGAGGAGAAGAACAAGAAGAACATCTGCAGCTACATCGACCTGATGCTGGTGCAC
 AGCAGAAAGCCCCAGGAGATGATCGACATCTGGAGCCAGCTGCAGAGCCCCAAC
 CTGAAGTGCTGAGCGGCCGCCCCCCC (Seq. ID. No. 12)

Fig. 13

mqwswifflsqtqgvlsQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGR
GLEWIGRIDPNSGGTKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDY
YGSSYFDYWGGTTVTVSSASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLS
 VTWSESGQNV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPS
 QDVTVPCPVPPPPPCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPS
 SGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKS
 GNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWA
 SRQEPSQGTTFVAVTSILRVAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTH
 VNVSVVMAEVDGTCY (Seq. ID. No. 13)

Fig. 14

CCCCAAGCTTATGGGCTGGAGCTGGATCTTCCTGTTCCCTGCTGAGCGGCACCGC
 CGGCGTGCTGAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCCGGCGCCGAGCTGGTGAAGC
 CCGGCGCCAGCGTGAAGCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCT
 ACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGACCCGGCAGAGGCCTGGAGTGGATCGGC
 AGAATCGACCCCAACAGCGGCGGCACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGAGCAAG
 GCCACCCTGACCGTGGACAAGCCCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGC
 CTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATACGACTACTACGGCA
 GCAGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGCCA
 GCCCCACCAGCCCCAAGGTGTTCCCCCTGAGCCTGGACAGCACCCCCCAGGAC
 GGCAACGTGGTGGTGGCCTGCCTGGTGCAGGGCTTCTTCCCCCAGGAGCCCCT
 GAGCGTGACCTGGAGCGAGAGCGGCCAGAACGTGACCGCCAGAACTTCCCCC
 CCAGCCAGGACGCCAGCGGCGACCTGTACACCACCAGCAGCCAGCTGACCCTG
 CCCGCCACCCAGTGCCCCGACGGCAAGAGCGTGACCTGCCACGTGAAGCACTAC
 ACCAACCCCAGCCAGGACGTGACCGTGCCCTGCCCCGTGCCCCCCCCCCCCCCC
 CTGCTGCCACCCCAGACTGAGCCTGCACAGACCCGCCCTGGAGGACCTGCTGCT
 GGGCAGCGAGGCCAACCTGACCTGCACCCTGACCGGCCTGAGAGACGCCAGCG
 GCGCCACCTTCACCTGGACCCCCAGCAGCGGCAAGAGCGCCGTGCAGGGCCCC
 CCCGAGAGAGACCTGTGCGGCTGCTACAGCGTGAGCAGCGTGCTGCCCGGCTG
 CGCCAGCCCTGGAACCACGGCGAGACCTTCACCTGCACCGCCGCCACCCCG
 AGCTGAAGACCCCCCTGACCGCCAACATCACCAAGAGCGGCAACACCTTCAGAC
 CCGAGGTGCACCTGCTGCCCCCCCCCAGCGAGGAGCTGGCCCTGAACGAGCTG
 GTGACCCTGACCTGCCTGGCCAGAGGCTTCAGCCCCAAGGACGTGCTGGTGAAG
 TGGCTGCAGGGCAGCCAGGAGCTGCCCAGAGAGAAGTACCTGACCTGGGCCAG
 CAGACAGGAGCCCAGCCAGGGCACCAACCTTCGCCGTGACCAGCATCCTGAG
 AGTGGCCGCCGAGGACTGGAAGAAGGGCGACACCTTCAGCTGCATGGTGGGCC
 ACGAGGCCCTGCCCTGGCCTTCACCCAGAAGACCATCGACAGACTGGCCGGCA
 AGCCACCCACGTGAACGTGAGCGTGGTGTATGGCCGAGGTGGACGGCACCTGC
 TACTGATCTAGACCCC (Seq. ID. No. 14)

Fig. 15

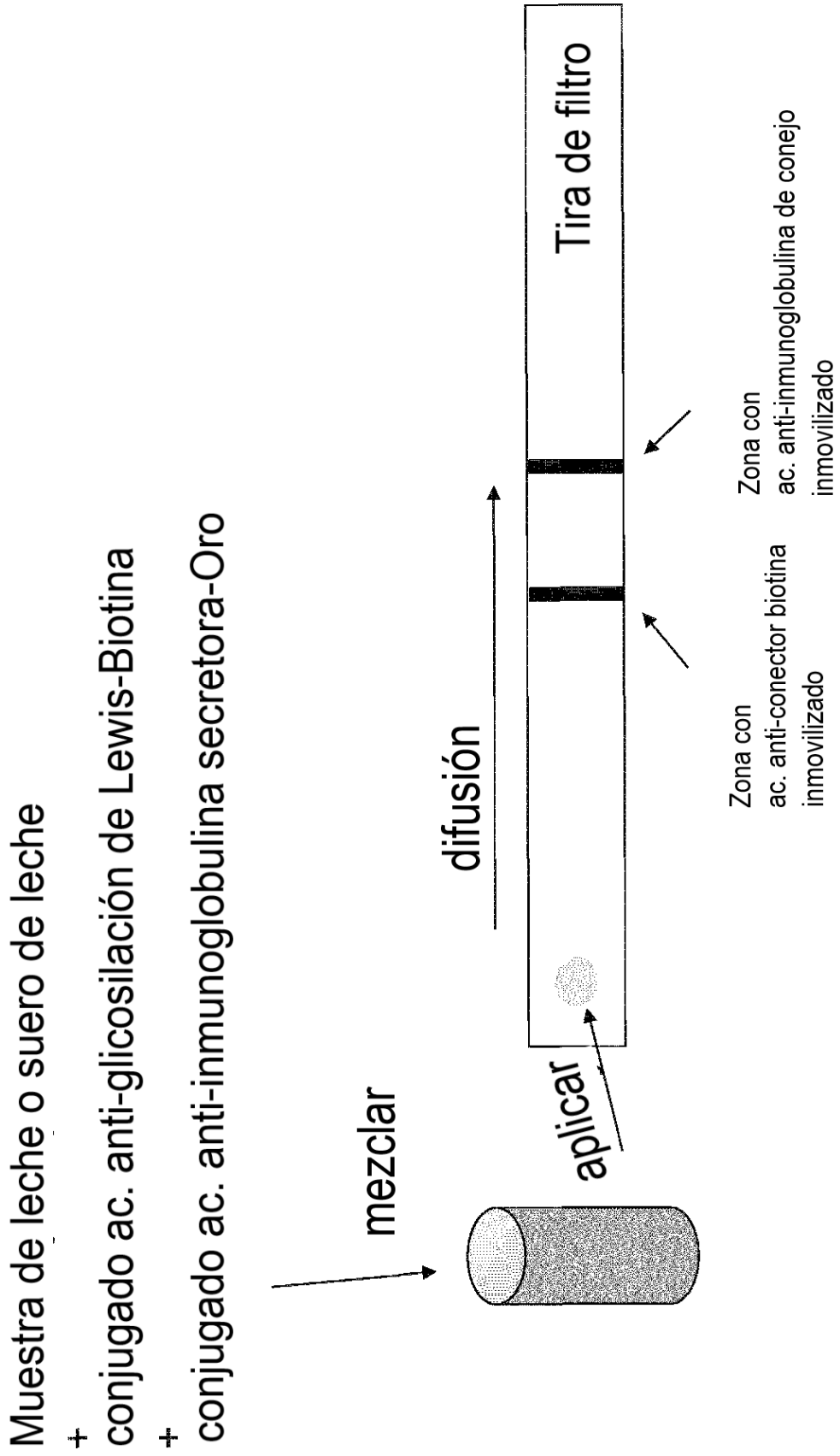
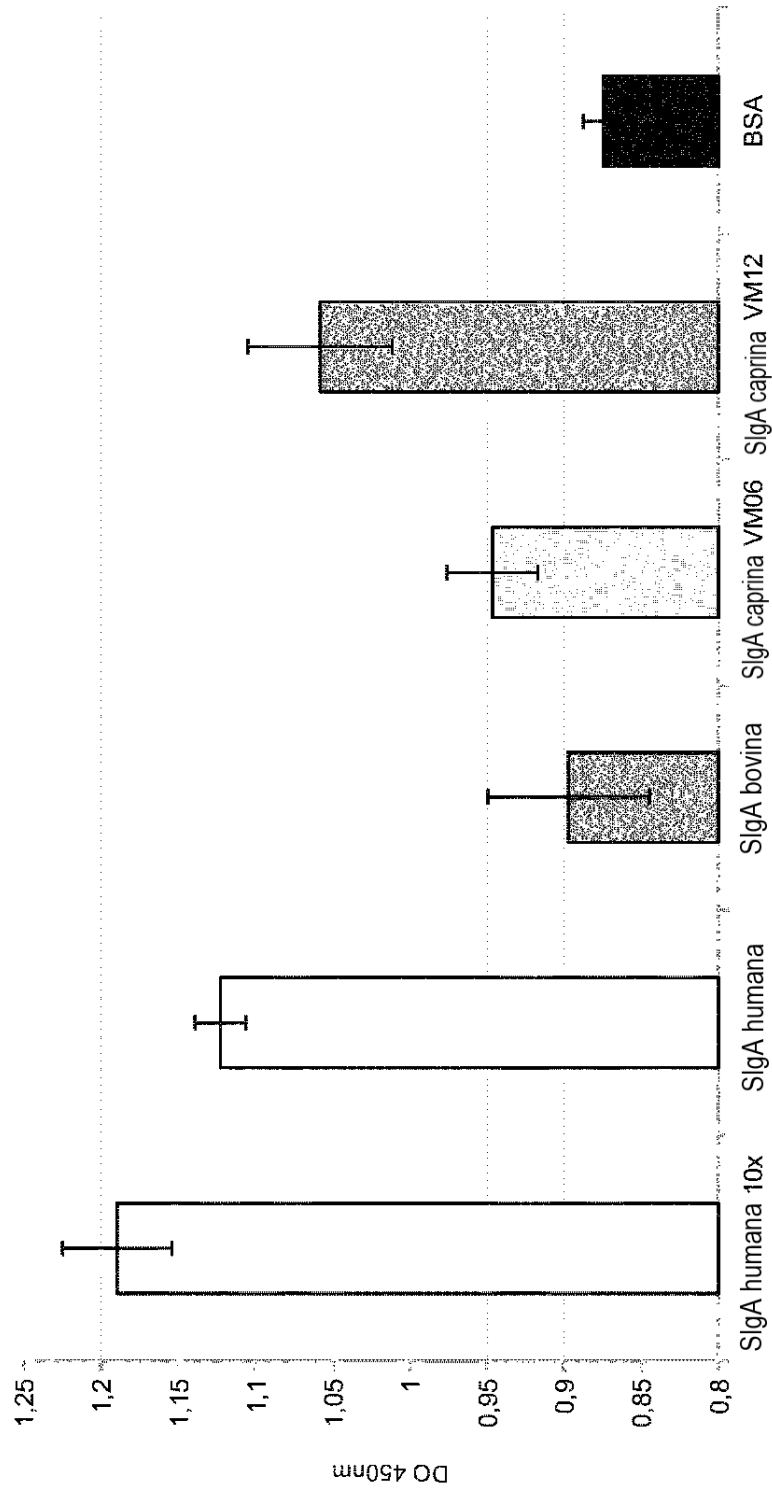
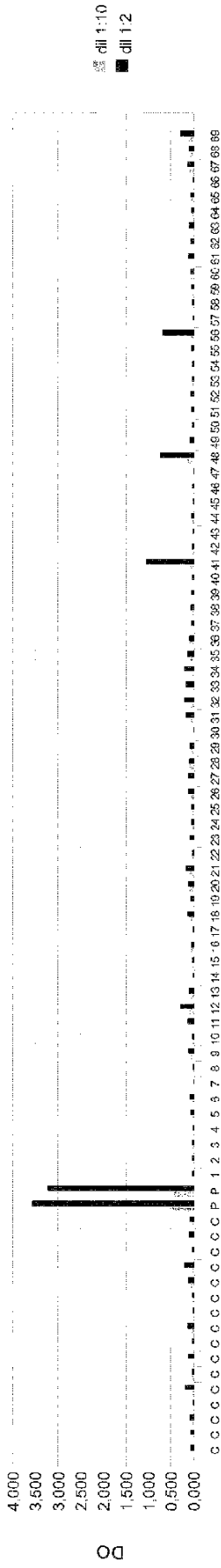
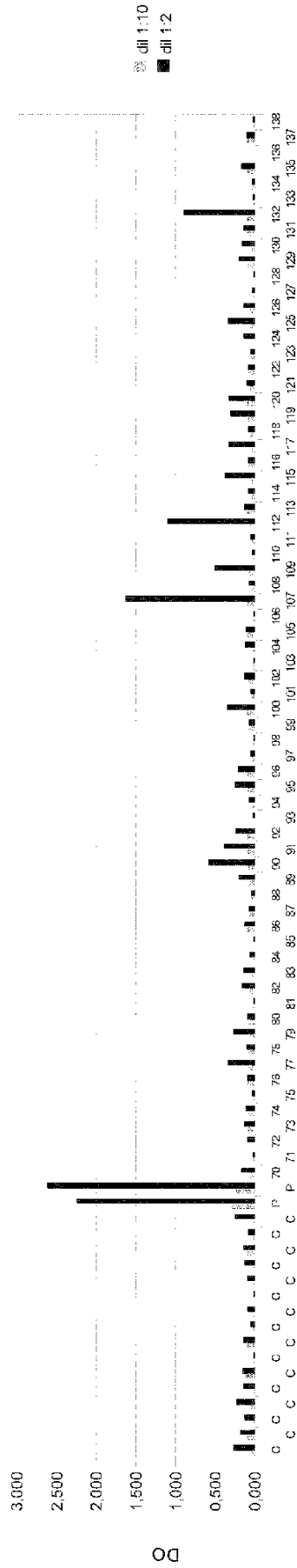


Fig. 16





Placa A



Placa B

Fig. 17