

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 657**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016** E 16181971 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** EP 3276005

54 Título: **Composición y método para afectar la unión de polipéptidos de unión a antígeno a antígenos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2019

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC GMBH (50.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE y
DÜBEL, STEFAN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DÜBEL, STEFAN;
KELLMANN, SARAH-JANE y
THIE, HOLGER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 708 657 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

Composición y método para afectar la unión de polipéptidos de unión a antígeno a antígenos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la modulación de unión de polipéptidos de unión a antígeno, en particular a un sistema basado en enlazador de calmodulina para dicha modulación.

Antecedentes de la invención

10 Los polipéptidos de unión a antígeno tales como fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) comprenden los dominios variables de la cadena ligera (V_L) y pesada (V_H) de un anticuerpo correspondiente de longitud completa. Una arquitectura similar también se ha aplicado a los receptores de células T estructuralmente similares (scTv), así como a los fragmentos scFab. En tales constructos, ambas cadenas están conectadas normalmente por un enlazador que es flexible y no muestra ninguna tendencia a interferir con el plegamiento de los dominios de inmunoglobulina individuales. En muchos casos, estos enlazadores contienen ensamblajes o variaciones de repeticiones (Gly_4Ser), inspiradas en los enlazadores no estructurados que conectan los dominios de la proteína III de la capa menor del bacteriófago filamentoso.

15 Los fragmentos de anticuerpos ScFv se usan ampliamente en una variedad de aplicaciones, tales como para investigación, propósitos de diagnóstico e incluso como agentes terapéuticos. Las inmunotoxinas, que se utilizan para terapia del cáncer, a menudo se basan en un fragmento de cadena sencilla fusionado con una toxina bacteriana para mediar en la destrucción selectiva. Otro enfoque se basa en los anticuerpos biespecíficos (BiTE, promotores de células T biespecíficas) que activan y redirigen las células T citotóxicas contra las células cancerosas. La terapia con células T con CAR (receptor de antígeno quimérico) también se basa en scFv específicos para células malignas. Es esencial para todas estas aplicaciones la extraordinaria especificidad, selectividad y afinidad de los paratopes de anticuerpos. Estas propiedades también serían muy útiles para la purificación de biomateriales, en particular proteínas, vacunas o células. Sin embargo, la afinidad generalmente muy alta de los anticuerpos requiere condiciones de elución severas, que normalmente afectan el plegamiento, la integridad o la viabilidad de los materiales eluidos. Por lo tanto, los anticuerpos que conservan su excelente especificidad mientras se ajustan con respecto a su afinidad sin requerir condiciones severas para este ajuste serían ventajosos para la purificación de proteínas, la separación celular y el análisis celular. Incluso la introducción de un anticuerpo ajustable por afinidad para la terapia se puede prever, por ejemplo, como un mecanismo de seguridad adicional en la terapia con células T con CAR.

30 Kobatake, E. et al. (2012, *Biotechnol Lett* 34, 1019-23) divulgan un anticuerpo de afinidad que puede ser cambiada en respuesta al calcio. El sistema se basa en un péptido de fusión que comprende scFv, calmodulina de tipo silvestre (TS) y un péptido de unión a calmodulina. El cambio se genera por la adición de calcio al sistema. Una desventaja es que la solución debe estar libre de calcio antes del cambio deseado.

35 Meister, G. E. y Joshi, N. S. (2013, *Chembiochem* 14, 1460-7) divulgan una enzima conmutable que se basa en la interacción de la calmodulina de TS y el péptido M13 soluble. En la forma unida a péptido, la enzima exhibe una actividad catalítica hasta 120 veces mayor en comparación con el estado inactivo (no unido a péptido).

El documento WO2002014371A1 divulga constructos de Fv que tienen una afinidad que puede ser influenciada para que una sustancia se enlace, en la que los constructos de Fv tienen péptidos unidos a las regiones variables y que contienen sitios de unión para moléculas efectoras. Las moléculas efectoras son iones o anticuerpos.

40 Guntas, G. et al., (2004, *Chem Biol* 11, 1483-7) y el documento WO2003078575A2 divulgan la creación de un interruptor molecular de la enzima TEM1 β -lactamasa al permutar circularmente el gen que codifica la enzima TEM1 β -lactamasa y luego insertarlo en el gen que codifica proteína de unión a maltosa de *E. Coli* que funciona como el enlazador.

45 El documento WO2005/072392A2 divulga interruptores moleculares, por ejemplo, con una actividad de cambio mayor que la demostrada anteriormente, o con reconocimiento y unión de ligandos alterados, y métodos para elaborar estas moléculas que implican la permutación circular de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos. Los interruptores moleculares se han creado mediante la recombinación de genes no homólogos *in vitro* y el sometimiento de los genes a la presión evolutiva utilizando técnicas combinatorias. El enfoque se concibe como el "rodamiento" de dos proteínas a través de las superficies de cada una y fusionándolas en los puntos donde sus superficies se encuentran. El enfoque permite la recombinación y la prueba de números máximos de configuraciones geométricas entre los dos dominios. Se proporcionan bibliotecas que comprenden vastas cantidades de tales moléculas fusionadas a partir de las cuales se pueden aislar interruptores moleculares con características óptimas.

Megeed, Z. et al., (2006, *Biomacromolecules* 7, 999-1004) divulgan un péptido de fusión de scFv con elastina como enlazador que da como resultado una afinidad dependiente de la temperatura del dominio de unión al antígeno con el antígeno.

55 Miyawaki, A. y col. (1997, *Nature* 388, 882-887) divulgan un polipéptido que comprende una proteína fluorescente, en

el que sus dominios están unidos por un péptido M13 de calmodulina. Baird et al. (1999, PNAS 96: 11241-11246) demostró que varios reordenamientos de GFP, en los que las porciones amino y carboxilo se intercambian y se vuelven a unir con un espaciador corto que conecta los terminales originales, todavía proporcionan fluorescencia. Estas permutaciones circulares han alterado los valores de pKa y las orientaciones del cromóforo con respecto a un compañero de fusión. Además, ciertas ubicaciones dentro de la GFP toleran la inserción de proteínas completas, y los cambios conformacionales en el inserto pueden tener efectos profundos en la fluorescencia. Por ejemplo, las inserciones de calmodulina o un dominio de dedo de zinc en lugar de Tyr-145 de un mutante amarillo (proteína fluorescente amarilla mejorada) de GFP dan como resultado proteínas indicadoras cuya fluorescencia se puede mejorar varias veces tras la unión del metal. El injerto de calmodulina en una proteína fluorescente amarilla mejorada puede controlar el Ca^{2+} citosólico en células de mamífero individuales.

Nagai et al. (2001, PNAS 98: 3197-3202) mostró mediante el uso de una proteína fluorescente verde permutada circularmente (cpGFP), en la que las porciones de amino y carboxilo se habían intercambiado y reconectado mediante un espaciador corto entre los extremos originales que podían visualizar las interacciones proteína-proteína dependientes de Ca^{2+} en células vivas mediante lecturas de fluorescencia. La cpGFP se fusionó con la calmodulina y su péptido derivado del ligando, M13. La proteína quimérica era fluorescente y sus propiedades espectrales cambiaron reversiblemente con la cantidad de Ca^{2+} .

La calmodulina (CaM) experimenta grandes cambios conformacionales, dependiendo de la presencia de calcio y péptidos de unión a calmodulina (CBP). En una forma no unida de calcio y péptido, adopta una conformación cerrada (Kuboniwa, H. et al., 1995, Nat Struct Biol 2, 768-776). La distancia entre el extremo terminal N y C es máxima en la forma abierta unida al calcio (Chattopadhyaya, R. et al., 1992, J Mol Biol 228, 1177-1192), mientras que los extremos terminales se aproximan entre sí cuando la calmodulina se une a un ligando, o un fragmento adecuado del mismo, como el péptido M13 (Ikura, M. et al., 1992, Science 256, 632-638).

Montigiani et al. (1996, J. Mol. Biol. 258: 6-13) y Hultschig et al. (2004, J. Mol. Biol. 343: 559-568) identificaron mutantes de alta afinidad del péptido de unión a CaM "M13" que se deriva de la quinasa de cadena ligera de la miosina de conejo.

Existe una necesidad en la técnica de una composición alternativa o mejorada y/o un método para afectar la unión de polipéptidos de unión a antígeno a sus antígenos respectivos.

Sumario de la invención

Sorprendentemente, los inventores demostraron que un polipéptido que comprende calmodulina (CaM) y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina (un "enlazador de calmodulina"), se puede usar para afectar en ambas direcciones la unión de dicho polipéptido a su antígeno al poner en contacto dicho polipéptido con una molécula de unión a la calmodulina y los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina. La unión concertada de dicha molécula de unión a calmodulina y de dichos iones a dicho sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina conduce a cambios conformacionales e influye en la unión de dicho polipéptido para que un antígeno se una a dicho polipéptido. El sistema (o composición) que comprende las tres partes i) el polipéptido con CaM como enlazador entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, ii) la molécula de unión a CaM, tal como un péptido de unión a CaM (por ejemplo, péptido M13), y iii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM, tal como Ca^{2+} , es superior en comparación con los sistemas conocidos en la técnica: no es un requisito previo para que un sistema funcional elimine los iones de calcio de la solución que comprende dicho polipéptido antes de cambiar la unión del polipéptido a su antígeno. El cambio solo se logra mediante la adición de moléculas de unión a CaM solubles, tales como el péptido M13, a la solución en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM. Esto es superior en comparación con los sistemas conocidos en la técnica, en particular para el uso en organismos vivos, por ejemplo cuando se usa para modular la afinidad de un CAR en una célula T u otra célula efectora adecuada, como en esta situación, la concentración de Ca^{2+} puede no ser suficientemente ajustable.

Incluso más sorprendentemente, se encontró que una permutación del componente enlazador, es decir, la calmodulina, daba como resultado un cambio aún más fuerte de la unión del polipéptido de la invención a su antígeno en comparación con el uso del CaM de TS descrito como enlazador, al menos por un factor de 2, como se muestra en el Ejemplo 5 (véase también las FIG. 5B, C, D). Regularmente, en la técnica se ha usado una permutación en sistemas comparables (polipéptidos con dominios de unión a antígeno) solo con respecto a la parte no enlazadora.

También inesperadamente el uso de variantes del péptido M13 normalmente usado o el uso de otros péptidos que no sean el péptido M13 en el sistema (o las composiciones) divulgados en este documento dio como resultado un cambio más fuerte de unión del polipéptido como se divulga en este documento a su antígeno en comparación con el uso del péptido M13 mismo.

Los mejores resultados con respecto a una modulación de enlace conmutable se logran cuando se combina CaM permutada con variantes del péptido M13 u otros péptidos distintos del péptido M13, algunas combinaciones específicas de las CaM permutadas definidas los péptidos de unión definidos a CaM son especialmente preferidos como se divulga en este documento.

Sorprendentemente, el cambio en la unión de los dominios de unión a antígeno del polipéptido desencadenado por la unión de una molécula de unión a CaM y los iones al enlazador de calmodulina del polipéptido puede resultar en una unión mejorada o en una unión reducida del polipéptido a su antígeno.

5 Los polipéptidos como se divulga en el presente documento pueden liberarse del antígeno de unión mediante la adición de moléculas de unión a CaM, tales como el péptido M13 y iones, tales como Ca^{2+} , sin condiciones adversas.

La aplicabilidad general de una secuencia de calmodulina como un enlazador universal para regular la unión de un polipéptido que comprende dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas se ha demostrado aquí en primer lugar para diferentes scFv, incluyendo uno específico para la lisozima, y en segundo lugar, otros scFv con afinidades bastante diferentes y clases de antígenos, incluyendo proteínas y haptenos.

10 En el presente documento se divulgan composiciones que comprenden los componentes mencionados anteriormente, métodos para afectar la unión de los polipéptidos y el uso de los polipéptidos para afectar la unión de los polipéptidos a sus antígenos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Clonación de variantes de calmodulina permutadas circularmente.

15 Figura 2: Identificación de variantes de calmodulina-scFv anti-lisozima intercambiables por ELISA competitivo.

Figura 3: Análisis del comportamiento de unión dependiente del péptido M13 de las variantes de calmodulina anti-scFv de lisozima mediante ELISA competitivo (A) y ELISA de liberación (B).

Figura 4: Evaluación de la disminución específica dependiente del péptido M13 de la señal de unión por ELISA de titulación (A, B, C, D, E, F, G, H).

20 Figura 5: Identificación de fusiones de calmodulina-scFv anti-CD14, anti-biotina y anti-CD4 conmutables mediante tinción competitiva de PBMC y análisis por citometría de flujo (A). Comparación de la extensión de las propiedades moduladoras de la unión de diferentes variantes del enlazador de calmodulina en scFv anti-CD14 (B), scFv anti-biotina (C) y scFv anti-CD4 (D).

Figura 6: Visión general de otros péptidos de unión a calmodulina con propiedades moduladoras de unión (A, B).

25 Figura 7: Identificación de péptidos de unión a calmodulina adicionales con propiedades moduladoras de unión - péptidos más prometedores (A, B, C).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición (un sistema, un conjunto o un kit) que comprende

30 i) un polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina; y

ii) una molécula de unión a la calmodulina; y

iii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina,

en la que la unión de dicha molécula de unión a la calmodulina y de dichos iones afecta la unión de dicho polipéptido a un antígeno que se une a dicho polipéptido.

35 La calmodulina es una secuencia de enlace entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas y sirve como un regulador alostérico universal de estos dos dominios. La CaM (o la secuencia de CaM) puede ser cualquier secuencia o parte de una secuencia de CaM que mantiene las características de la proteína calmodulina de TS para unirse tanto a iones en el sitio de unión de Ca^{2+} como a una molécula de unión a calmodulina, y por lo tanto cambiando su conformación. Esto incluye una calmodulina o una secuencia de calmodulina con una identidad de secuencia de al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% a nivel de la secuencia de aminoácidos con la calmodulina de tipo silvestre.

40 La secuencia de calmodulina también puede ser un fragmento funcional de la proteína de calmodulina de longitud completa (por ejemplo, una proteína truncada de calmodulina) o un fragmento de la proteína calmodulina de longitud completa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% al nivel de secuencia de aminoácidos con la parte correspondiente de dicha calmodulina de longitud completa.

45 En general, todas las variaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos de la calmodulina) están incluidas en esta definición, que no conducen a la pérdida de las características descritas de la calmodulina para proporcionar el cambio alostérico o un fragmento funcional de la misma para unir tanto iones en

50

el lado de unión de Ca^{2+} como una molécula de unión a calmodulina, y por lo tanto cambiar su conformación.

La composición como se divulgó anteriormente, en la que dicha unión de dicha molécula de unión a calmodulina y de dichos iones al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina potencia o reduce la unión de dicho polipéptido a dicho antígeno.

- 5 Dicha molécula de unión a calmodulina puede ser un péptido de unión a calmodulina. Dicho péptido de unión a la calmodulina puede seleccionarse y derivarse del grupo de ligandos de calmodulina naturales que consisten en la quinasa de la cadena ligera de miosina, caldesmona, calspermina, fosfofructoquinasa, calcineurina, ATPasa de calcio, espectrina, receptor de glutamato, oxidasa nítrica sintasa, proteína serina/treonina fosfatasa, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor de estrógeno, subunidades de los canales de calcio y proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina. Dicho péptido de unión a CaM puede ser un péptido M13 derivado de la quinasa de cadena ligera de miosina de conejo o una variante de la misma.

- 10 Dicho péptido de unión a calmodulina puede seleccionarse del grupo de péptidos que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 65. Preferentemente, dicho péptido de unión a calmodulina puede seleccionarse del grupo de péptidos que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 53.

- 15 Pero en general, se puede usar cualquier péptido o polipéptido que pueda unirse a CaM y, por lo tanto, proporcione el cambio alostérico.

- 20 Estructuras tridimensionales de calmodulina en complejo con sustratos peptídicos de alta afinidad están disponibles (Montigiani et al., 1996, J. Mol. Biol. 258: 6-13). Estos péptidos corresponden a las regiones de unión a la calmodulina de diferentes proteínas quinasas. Alternativamente, los métodos tales como la presentación en fagos peptídicos, la presentación en ribosomas u otros sistemas de selección combinatoria establecidos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ullman CG et al. Brief Funct Genomics, mayo de 2011; 10 (3): 125-34 o Galán A et al. Mol Biosyst, 16 de junio de 2016 [publicación electrónica antes de la impresión]) puede usarse para identificar variantes de secuencias naturales o secuencias sintéticas que pueden unirse a la calmodulina.

- 25 Dichos iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina pueden ser cualquier ión que pueda unirse mediante el sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina, lo que resulta en un cambio conformacional de la CaM en presencia de una molécula de unión a CaM, preferiblemente, dichos iones son iones de calcio (Ca^{2+}).

- 30 Dicha calmodulina puede ser una calmodulina permutada. En general, se puede generar una CaM permutada, por ejemplo, mediante permutación circular, un método general para permutar proteínas que es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, "Circular Permutation of Proteins" en "Protein Engineering Handbook" (Ed.: Stefan Lutz, Uwe T. Bornscheuer) Wiley-VCH 2009), y como se describe en el presente documento.

- 35 Alternativamente, una CaM permutada puede generarse sintéticamente a nivel de ácido nucleico o aminoácido, especialmente puede generarse sintéticamente cuando la secuencia que se pretende usar para la generación del polipéptido como se divulga en el presente documento que comprende la CaM permutada es conocida y puede generarse a propósito.

- Como se demuestra en el presente documento, la gran mayoría de las calmodulinas permutadas generadas y utilizadas en este documento inducen una regulación de la unión de los polipéptidos como se divulga en este documento (FIG. 2) mediante la adición de diferentes moléculas de unión a CaM y iones tales como Ca^{2+} , en donde la regulación de la unión es más distinta que la regulación por la CaM de tipo silvestre (FIG. 5B, C, D).

- 40 Dicho polipéptido de dicha composición que comprende dicha calmodulina permutada y dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina permutada se puede obtener, por ejemplo, por el método que comprende

- a) Creación de al menos una secuencia de ácido nucleico de inserción que codifica una calmodulina permutada
- b) Creación de una secuencia de ácido nucleico aceptor que codifica un polipéptido que comprende dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas
- c) Insertar al menos una secuencia de inserción de a) en la secuencia aceptor de b), en la que se inserta una secuencia de inserción de a) entre las partes de la secuencia aceptor b) que codifican los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas de b)
- d) Transformar un huésped con las secuencias de ácido nucleico de c)
- 45 e) Selección de los huéspedes transformados que albergan la secuencia o secuencias de c)

f) Detección de los huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas unidos a través de calmodulina permutada exponiendo los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión a calmodulina e identificando los huéspedes

transformados que albergan polipéptidos que impactan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en la presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina.

5 La calmodulina permutada de la composición como se describió anteriormente puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 67 a la SEQ ID NO: 123. Preferiblemente, la calmodulina permutada de la composición como se describió anteriormente se puede seleccionar del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 67 a la SEQ ID NO: 72. Lo más preferible es que la calmodulina permutada se pueda seleccionar del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 67, la SEQ ID NO: 68, la SEQ ID NO: 71 y la SEQ ID NO: 72.

Una composición preferida como se divulga en el presente documento puede comprender

10 i) un polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina; y

ii) una molécula de unión a la calmodulina; y

iii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina,

en donde la unión de dicha molécula de unión a la calmodulina y de dichos iones afecta la unión de dicho polipéptido a un antígeno que se une a dicho polipéptido,

15 en donde dicha calmodulina permutada tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 y dicho péptido de unión a la calmodulina tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 46, o en donde dicha calmodulina permutada tiene la secuencia SEQ ID NO: 68 y dicho péptido de unión a calmodulina tiene la secuencia SEQ ID NO: 53, o en donde dicha calmodulina permutada tiene la secuencia seleccionada del grupo que
20 consiste en las secuencias SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y dicho péptido de unión a la calmodulina tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 53.

25 Dicha composición, en donde dicho polipéptido puede ser un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la calmodulina y una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (V_H) y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (V_L).

Se prefiere especialmente una composición como se describió anteriormente, en la que el polipéptido que comprende un scFv específico para el antígeno CD14 y una CaM permutada tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 124 y dicho péptido de unión a la CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 125 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la
30 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 53, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 126 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 47, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 127 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 47 o la SEQ ID NO: 53.

35 Además, se prefiere especialmente una composición como la descrita anteriormente, en la que el polipéptido que comprende un scFv específico para biotina y una CaM permutada tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 128 y dicho péptido de unión a la CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 46, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 129 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 46, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 130 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 53.

40 Además, se prefiere especialmente una composición como la descrita anteriormente, en la que el polipéptido que comprende un scFv específico para el antígeno CD4 y una CaM permutada tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 131 y dicho péptido de unión a la CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 46, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 132 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 46, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 133 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia
45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 53, o dicho polipéptido tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 134 y dicho péptido de unión a CaM tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 53.

Como es evidente por la Figura 7A, B y C (o el Ejemplo 6), dichas combinaciones de secuencias específicas de CaM permutada y péptidos de unión a CaM muestran los cambios más fuertes en la unión entre dichos polipéptidos y sus antígenos, respectivamente.

50 Dicha composición, en la que dicho polipéptido es parte de un dominio de unión a antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR). Dicho CAR puede comprender un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio o dominios de señalización citoplasmática.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para afectar la unión de un polipéptido a un antígeno que se va a unir, en el que dicho polipéptido comprende una calmodulina y dos dominios de la superfamilia de

inmunoglobulinas en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto dicho polipéptido con una molécula de unión a calmodulina en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina, afectando así la unión de dicho polipéptido al antígeno.

5 Preferentemente, la CaM es una CaM permutada como se describió anteriormente.

Preferentemente, la molécula de unión a CaM es un péptido de unión a CaM como se describió anteriormente.

Dicho método para afectar la unión de un polipéptido, en el que antes de dicho contacto de dicha molécula de unión a calmodulina con dicha calmodulina, dicho polipéptido se pone en contacto con el antígeno que se une mediante dicho polipéptido, y en el que dicho contacto de dicha molécula de unión a calmodulina a dicha calmodulina en la presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina afecta la unión de dicho polipéptido al antígeno. Dicha afectación de la unión puede ser una reducción (disminución) de la unión, liberando así el polipéptido del antígeno. Alternativamente, dicha afectación de la unión puede ser una mejora (un aumento) de la unión, mejorando así la unión entre dicho polipéptido y el antígeno. La mejora de dicha unión puede ser de interés cuando la unión de dicho polipéptido al antígeno es débil o no se produce en ausencia de dicha molécula de unión de CaM y dichos iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM.

Dicha afectación de la unión puede ser un cambio de una o ambas propiedades cinéticas de la reacción de unión (las constantes de velocidad de asociación y disociación, o la constante de asociación y la constante de disociación) mientras que la afinidad general puede cambiarse (afectando la afinidad) en este proceso o permanecerá igual (afectando a la cinética de unión pero no a la afinidad de equilibrio), cambiando así la cinética de la interacción del polipéptido con el antígeno.

Dicha afectación de la unión puede ser un cambio alostérico inducido dentro del antígeno.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un polipéptido (como se describió anteriormente) que comprende una calmodulina, preferiblemente una calmodulina permutada, y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en donde dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina, preferiblemente dicha calmodulina permutada, para afectar en presencia de una molécula de unión a calmodulina y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina, la unión de dicho polipéptido a un antígeno a unirse mediante dicho polipéptido.

Realizaciones

En una realización de la invención, la composición comprende

30 i) un polipéptido tal como un scFv, por ejemplo, el scFv D1.3 de unión a lisozima, que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 135, que comprende calmodulina tal como CaM permutada, por ejemplo, que tiene la secuencia del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 67 a la SEQ ID NO: 123 y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, tales como una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina (V_H) y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina (V_L), en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina; y

ii) una molécula de unión a la calmodulina, tal como el péptido M13; y

iii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina tal como Ca^{2+} ,

en donde la unión de dicha molécula de unión a la calmodulina y de dichos iones a dicho sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina afecta la unión de dicho polipéptido a un antígeno tal como lisozima reduciendo dicha afinidad.

40 En una realización de la invención, la composición se puede usar para el enriquecimiento (por ejemplo, selección positiva) de células que expresan en la superficie celular el antígeno reconocido por el polipéptido, por ejemplo, como se divulga en el presente documento. Los métodos adecuados para el enriquecimiento son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, citometría de flujo, como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la separación de células magnéticas, tal como MACS® (Miltenyi Biotec GmbH).

45 A modo de ejemplo, se describe en este documento el principio de la separación de MACS® (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania): el polipéptido como se divulga en el presente documento, específico para un antígeno, se puede usar para la marcación magnética directa o indirecta de células que expresan dicho antígeno en su superficie celular en una muestra que comprende dichas células y otras células (que no expresan dicho antígeno). Primero, las células que expresan antígeno se marcan magnéticamente con MicroBeads (partículas magnéticas) conjugadas con dicho polipéptido. Luego, la muestra de células se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo magnético de un separador MACS®. Las células que expresan antígeno marcadas magnéticamente se retienen en la columna. Las células sin marcar corren a través de la misma. La adición de una solución de "elución" que comprende una molécula de unión a CaM tal como el péptido M13 y, por ejemplo, los iones Ca^{2+} permiten reducir la unión del polipéptido al antígeno, liberando así la célula que expresa dicho antígeno del polipéptido inmovilizado conjugado con la partícula

magnética, es decir, la célula se puede eluir de la columna sin necesidad de eliminar el campo magnético.

En una realización de la invención, la composición puede usarse para el enriquecimiento (es decir, la purificación) de proteínas fusionadas con un antígeno reconocido por el polipéptido que comprende un scFv que comprende calmodulina, preferiblemente una CaM permutada, y una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina, en la que dichas regiones variables están unidas a través de dicha calmodulina, preferiblemente CaM permutada. La invención de polipéptidos como se describe en el presente documento puede inmovilizarse, por ejemplo, sobre una resina. A continuación, la proteína objetivo (es decir, la proteína que debe ser purificada) que contiene material se incubaba con la resina acoplada al polipéptido para permitir la unión del polipéptido a la proteína objetivo fusionada con un antígeno reconocido por el polipéptido de la invención. El material no unido se elimina mediante lavado del material de resina. La adición de una solución de "elución" que comprende una molécula de unión a CaM tal como el péptido M13 y, por ejemplo, los iones Ca^{2+} permiten reducir la unión del polipéptido a la proteína objetivo que comprende el antígeno, liberando así la proteína objetivo sin la necesidad de condiciones de elución severas.

En una realización de la invención, el polipéptido es un scFv que comprende la calmodulina, preferiblemente una CaM permutada, y una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina, en la que dichas regiones variables están enlazadas a través de dicha calmodulina, preferiblemente CaM permutada, y en la que dicho scFv es el dominio de unión a antígeno (o parte del dominio de unión a antígeno) de un receptor de antígeno quimérico (CAR). El CAR puede comprender dicho dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y dominios de señalización citoplasmática. Dicho CAR puede liberarse de un antígeno unido a dicho CAR poniendo en contacto dicho CAR con una molécula de unión a CaM y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM, si dicho contacto da como resultado una reducción de la unión del dominio de unión al antígeno con el antígeno. Alternativamente, dicho CAR puede unirse suficientemente fuerte al antígeno para inducir o activar la señalización en la célula que expresa dicho CAR, no hasta que una molécula de unión a CaM y los iones que se unen al sitio de enlace de Ca^{2+} de CaM se pongan en contacto con dicho CAR, si dicho contacto da como resultado un aumento de la unión del dominio de unión al antígeno con el antígeno. Estos procedimientos permiten un control de las interacciones entre las células que expresan dicho CAR y el antígeno al proporcionar un péptido pequeño, ya que el calcio puede estar presente en cantidades fisiológicas suficientes. Esto puede ayudar a reducir o prevenir los efectos secundarios graves en un paciente si las células que expresan dicho CAR se usan en una inmunoterapia celular, por ejemplo, para combatir células cancerosas en un paciente.

En una realización de la invención, la composición es una composición que comprende

i) un polipéptido que comprende una calmodulina permutada y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas se enlazan a través de dicha calmodulina,

ii) una molécula de unión a calmodulina; y

iii) iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de calmodulina,

en la que la unión de dicha molécula de unión a calmodulina y de dichos iones afecta la unión de dicho polipéptido a un antígeno que se une por dicho polipéptido, y en la que dicho polipéptido es obtenible por el método que comprende las etapas de

a) crear una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos de inserción, en la que dicha secuencia de inserción comprende una secuencia que codifica dicha calmodulina permutada que comprende las etapas de:

i) obtener una secuencia de ácido nucleico de inserción que codifica calmodulina que se une a una molécula de unión a calmodulina y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina;

ii) ligar dicha secuencia de ácido nucleico de inserción para circularizar dicha secuencia de ácido nucleico de inserción;

iii) crear pares de oligonucleótidos que permitan la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico de inserción permutada mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de ácido nucleico de inserción circularizada de ii) como plantilla y que además comprenden salientes de ácido nucleico con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción

iv) realizar una reacción en cadena de la polimerasa utilizando la secuencia de ácido nucleico de inserción circularizada de ii) y los pares de oligonucleótidos de iii) para permitir la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico de inserción permutada;

v) digerir dicha secuencia de ácido nucleico de inserción permutada de iv) con enzimas de restricción que reconocen dichas secuencias de reconocimiento para permitir la introducción específica de la secuencia de ácido nucleico de inserción digerida en la secuencia de ácido nucleico aceptor;

b) crear una secuencia de ácido nucleico aceptor, en la que dicha secuencia de ácido nucleico aceptor comprende una secuencia que codifica dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, que comprende las etapas

de:

- i) obtener dicha secuencia de ácido nucleico aceptor que comprende las mismas secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción de a) iii) entre las secuencias que codifican dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas;
- 5 ii) digerir dicha secuencia de ácido nucleico aceptor de i) con dichas enzimas de restricción que reconocen dichas secuencias de reconocimiento que permiten la introducción de la secuencia de ácido nucleico de inserción permutada de a) v) entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas de dicha secuencia de ácido nucleico aceptor;
- c) ligar los ácidos nucleicos de a) v) y b) ii) de modo que una secuencia de ácido nucleico de inserción se inserte en la secuencia de ácido nucleico aceptor digerida;
- 10 d) transformar un huésped con uno o una biblioteca de las secuencias ligadas de c);
- e) seleccionar los huéspedes transformados que albergan las secuencias de ácido nucleico ligado;
- f) detectar los huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina unidos a través de calmodulina exponiendo los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión de calmodulina e identificar los huéspedes transformados que albergan polipéptidos que impactan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina; o
- 15 β) a) crear una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos de inserción, en la que dicha secuencia de inserción comprende una secuencia que codifica dicha calmodulina permutada que comprende las etapas de:
- i) obtener una secuencia de ácido nucleico de inserción que codifica calmodulina que se une a una molécula de unión a calmodulina y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de calmodulina;
- 20 ii) ligar dicha secuencia de ácido nucleico de inserción para circularizar dicha secuencia de ácido nucleico de inserción;
- iii) digerir la secuencia de ácido nucleico de inserción de ii) para introducir aleatoriamente una única ruptura de doble cadena para la creación de una biblioteca de secuencias de ácido nucleico de inserción;
- b) crear una secuencia de ácido nucleico aceptor, en la que dicha secuencia de ácido nucleico aceptor comprende una secuencia que codifica dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, que comprende las etapas de:
- 25 i) obtener dicha secuencia de ácido nucleico aceptor;
- ii) digerir dicha secuencia de ácido nucleico aceptor de i) con enzimas de restricción que reconocen secuencias de reconocimiento que permiten la introducción de la biblioteca de secuencias de ácido nucleico de inserción entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina de dicha secuencia de ácido nucleico aceptor; opcionalmente
- 30 iii) Volver roma dicha secuencia aceptadora si dichas enzimas de restricción producen extremos pegajosos
- c) ligar los ácidos nucleicos de la biblioteca de a) iii) y b) ii), opcionalmente b) iii) de modo que una secuencia de ácido nucleico de inserción se inserte en la secuencia de ácido nucleico aceptor digerida;
- d) transformar un huésped con la biblioteca de las secuencias ligadas de c);
- 35 e) seleccionar los huéspedes transformados que albergan las secuencias de ácido nucleico ligado;
- f) detectar los huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina unidos a través de calmodulina exponiendo los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión a calmodulina e identificar los huéspedes transformados que albergan polipéptidos que impactan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina; o
- 40 y) a) crear una secuencia de ácido nucleico de inserción o una biblioteca de secuencias que codifica dicha calmodulina permutada que comprende las etapas de:
- i) generar sintéticamente dicha secuencia de ácido nucleico de dicha calmodulina permutada que comprende salientes de ácido nucleico con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción;
- 45 ii) digerir dicha secuencia de ácido nucleico de inserción permutada de i) con enzimas de restricción que reconocen dichas secuencias de reconocimiento para permitir la introducción específica de la secuencia de ácido nucleico de inserción digerida en la secuencia de ácido nucleico aceptor;
- b) crear una secuencia de ácido nucleico aceptor, en la que dicha secuencia de ácido nucleico aceptor comprende

una secuencia que codifica dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, que comprende las etapas de:

- 5 i) obtener dicha secuencia de ácido nucleico aceptor que comprende las mismas secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción de a) i) entre las secuencias que codifican dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina;
- ii) digerir dicha secuencia de ácido nucleico aceptor de i) con dichas enzimas de restricción que reconocen dichas secuencias de reconocimiento que permiten la introducción de la secuencia de ácido nucleico de inserción permutada de a) ii) entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina de dicha secuencia de ácido nucleico aceptor;
- 10 c) ligar los ácidos nucleicos de a) ii) y b) ii) de modo que una secuencia de ácido nucleico de inserción se inserte en la secuencia de ácido nucleico aceptor digerida;
- d) transformar un huésped con uno o una biblioteca de las secuencias ligadas de c);
- e) seleccionar los huéspedes transformados que albergan las secuencias de ácido nucleico ligado;
- 15 f) detectar los huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina unidos a través de calmodulina mediante la exposición de los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión a calmodulina e identificar los huéspedes transformados que albergan polipéptidos que afectan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina; o
- δ) a) crear las secuencias de ácido nucleico que codifican dicho polipéptido que comprende dicha calmodulina permutada mediante la creación sintética de dichas secuencias de ácido nucleico
- 20 b) transformar un huésped con una o una biblioteca de las secuencias de a);
- c) seleccionar los huéspedes transformados que albergan las secuencias de ácido nucleico;
- d) detectar huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina unidos a través de calmodulina exponiendo los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión a calmodulina e identificar los huéspedes transformados que albergan polipéptidos que impactan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina.
- 25

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 30 El término "calmodulina" o "secuencia de calmodulina" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% a nivel de la secuencia de aminoácidos de la calmodulina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 66) si la calmodulina no experimentó una permutación. En este contexto, la "identidad de secuencia" puede determinarse utilizando
- 35 alineamientos de pares usando programas de alineamientos para secuencias de aminoácidos bien conocidas en la técnica.

- La secuencia de calmodulina también puede ser un fragmento funcional de la proteína calmodulina de longitud completa (por ejemplo, una proteína truncada de calmodulina) o un fragmento de la proteína calmodulina de longitud completa que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% a nivel de la secuencia de aminoácidos con la secuencia correspondiente de dicha calmodulina de longitud completa si esta parte de la secuencia de calmodulina no experimentó una permutación.
- 40

- En general, todas las variaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos de la calmodulina) se incluyen en esta definición, que no conducen a la pérdida de la función de la calmodulina o un fragmento funcional de la misma para proporcionar el cambio de su conformación.
- 45

- La calmodulina o un fragmento funcional de la misma (en todas sus variantes como se describió anteriormente) también puede ser una calmodulina permutada o un fragmento funcional de la misma. Aunque el orden de secuencia se puede cambiar en una calmodulina permutada, mantiene las características de la calmodulina de TS para unirse tanto a, los iones en el sitio de unión de Ca^{2+} como a una molécula de unión a calmodulina, y por lo tanto cambiando su conformación (es decir, el fragmento de la calmodulina permanece funcional). Se puede generar una CaM permutada, por ejemplo, por un método que utiliza permutación circular. Una permutación circular es una relación entre proteínas en la que las proteínas tienen un orden cambiado de aminoácidos en su secuencia peptídica. El
- 50

resultado es una estructura de proteínas con diferente conectividad, pero en general con una forma tridimensional similar (3D).

La permutación circular puede ocurrir como resultado de eventos evolutivos naturales, modificaciones postraduccionales o mutaciones creadas artificialmente.

5 Debido a esto, a menudo es posible diseñar permutaciones circulares de proteínas. Hoy en día, las permutaciones circulares se generan de forma rutinaria en el laboratorio utilizando técnicas genéticas estándar (véase, por ejemplo, "Circular Permutation of Proteins" en "Protein Engineering Handbook" (Ed.: Stefan Lutz, Uwe T. Bornscheuer) Wiley-VCH 2009).

10 Una calmodulina permutada como se usa en el presente documento también puede tener algunos residuos de aminoácidos adicionales en su secuencia. Esto puede ser el resultado de la generación de una CaM permutada debido a, por ejemplo, adición de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción a nivel de la secuencia de ácido nucleico de dicha calmodulina. La secuencia adicional puede ser cualquier secuencia, preferiblemente la secuencia puede ser una secuencia que no dé lugar a cambios conformacionales mayores (o cualquier cambio) cuando la posición de dicha secuencia adicional cambia dentro del polipéptido, por ejemplo, debido al proceso de permutación de CaM que incluye dicha secuencia adicional. En este contexto, una secuencia adicional bien adecuada puede ser la secuencia de aminoácidos GGSG dentro de la CaM permutada como el resultado de la secuencia de ácido nucleico reconocida por la enzima de restricción *Bam*HI, que puede usarse en los extremos de la secuencia de ácido nucleico de CaM, resultando en la secuencia adicional a nivel de aminoácidos de GGSG después de la digestión de la secuencia de ácido nucleico con *Bam*HI y posterior circularización de la secuencia y traducción en un polipéptido. Esta secuencia adicional conduce a cambios conformacionales menores o no, independientemente de la posición dentro de la CaM permutada y no afecta la unión del polipéptido como se divulga en este documento con su antígeno.

20 En general, la permutación del enlazador de calmodulina como se divulga en el presente documento puede estar en cualquier posición de la secuencia de calmodulina, preferiblemente las calmodulinas permutadas (los enlazadores de calmodulina permutados) son variantes permutadas en el extremo C terminal o aquellas permutadas en el medio del gen que codifica la calmodulina anterior.

25 Aunque algunos sitios de permutación evitan que la proteína se pliegue correctamente, se han creado muchos permutantes con una función casi idéntica a la proteína original.

30 El término "calmodulina permutada", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos derivada de calmodulina que tiene un orden alterado de aminoácidos en su secuencia peptídica en comparación con la secuencia de calmodulina de TS, pero guarda las características de CaM para cambiar su conformación cuando la secuencia alterada de CaM se une a una molécula de unión a CaM y los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la CaM, en la que dicho cambio conformacional afecta la unión del polipéptido como se divulga en este documento a su antígeno.

35 El término "dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas" en el contexto de "un polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas" como se usa en el presente documento se refiere al uso de dos dominios asociados con la superfamilia de inmunoglobulinas dentro de dicho polipéptido. En general, todas las variaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones o eliminaciones) de aminoácidos de un dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas están incluidas en esta definición, que no conducen a la pérdida de la función del dominio que contribuye a la unión del antígeno. La superfamilia de inmunoglobulinas es un gran grupo de proteínas de la superficie celular y solubles que participan principalmente en los procesos de reconocimiento, unión o adhesión de las células. Moléculas categorizadas como miembros de esta superfamilia basadas en características estructurales compartidas con inmunoglobulinas; todas ellas poseen un dominio conocido como dominio de inmunoglobulina o pliegue. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas incluyen receptores de antígenos de la superficie celular, moléculas correceptores y coestimuladoras del sistema inmunitario, moléculas involucradas en la presentación de antígenos a linfocitos, moléculas de adhesión celular, ciertos receptores de citoquinas y proteínas musculares intracelulares. Un ejemplo específico de los "dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas" es un fragmento Fv de una inmunoglobulina, que comprende una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina.

40 Un fragmento variable de una sola cadena (scFv) es una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de las inmunoglobulinas, normalmente conectadas con un péptido enlazador corto de hasta aproximadamente 25 aminoácidos. El enlazador a menudo es rico en glicina para la flexibilidad, así como serina o treonina para la solubilidad, y puede conectar el extremo terminal N de la V_H con el extremo terminal C de la V_L , o viceversa. Esta proteína conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador. En la presente invención, el enlazador se reemplaza por la secuencia de calmodulina. Otro ejemplo específico de los "dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas" son las cadenas variables de los receptores de células T, que comparten propiedades estructurales generales muy similares al fragmento Fv, y constituyen un scTv que contiene la secuencia de calmodulina como un enlazador. Estos scTv pueden incluir las regiones variables de las cadenas α y β o las regiones variables de las cadenas γ y δ .

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" pretende incluir sustancias que se unen o evocan la producción de uno o más anticuerpos o se unen a los scFv, scTv o entidades de unión análogas mencionadas anteriormente compuestas por dos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Cada anticuerpo se une a un antígeno específico mediante una interacción similar al ajuste entre una cerradura y una llave. La sustancia puede ser del ambiente externo o formada dentro del cuerpo. El término "antígeno" comprende, pero no se limita a, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligopéptidos, lípidos, carbohidratos, haptenos, vitaminas, hormonas, moléculas sintéticas y combinaciones de los mismos, por ejemplo, una proteína glicosilada, un glicolípido o una vitamina biotinilada. Un antígeno puede estar en la superficie celular o dentro de la célula. Preferiblemente, un antígeno está en la superficie celular de una célula. En otra realización, el antígeno está en solución en una mezcla compleja de otras sustancias, como en el sobrenadante de cultivo de un biorreactor o una fracción derivada del mismo. En otra realización, el antígeno está en solución en una mezcla compleja de otras proteínas, como plasma sanguíneo u otros fluidos corporales o un sobrenadante del medio de cultivo del biorreactor.

El área del anticuerpo que se localiza hacia el antígeno e incluye cadenas laterales de aminoácidos que forman enlaces químicos como enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos o interacciones hidrófobas con el antígeno, se denomina "paratópo". Es un efecto lograr mediante la presente invención influir en la estructura de este paratópo de manera que su unión al antígeno se vea influida por la alteración de la posición, orientación, distancia o energía de unión de una o varias de dichas cadenas laterales de aminoácidos o de todo el dominio V al antígeno.

Los términos "se une específicamente a" o "específico para" con respecto a un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, un scFv o scTv) se refieren a un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a un antígeno específico, pero no reconoce o se une sustancialmente a otros antígenos en una muestra. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de una especie puede unirse también al antígeno homólogo de otra especie. Esta reactividad de especies cruzadas es típica de muchos anticuerpos y, por lo tanto, no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a diferentes formas alélicas del antígeno (variantes alélicas, variantes de empalme, isoformas, etc.) o variantes homólogas de este antígeno de la misma familia de genes. Estas reactividades cruzadas son típicas de muchos anticuerpos y, por lo tanto, no son contrarias a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno también puede unirse a un número limitado de estructuras completamente diferentes, conocidas como mimótopos (véase, por ejemplo, Reineke U. et al., J. Immunol Methods. septiembre 1 de 2002; 267 (1): 37-51; Keitel T. et al., Cell., diciembre 12 de 1997; 91 (6): 811-20). Esta reactividad es típica de muchos anticuerpos y, por lo tanto, no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico.

El término "que afecta a la unión" como se usa en el presente documento se refiere a un cambio de una o ambas propiedades cinéticas de la reacción de unión (las constantes de velocidad de asociación y disociación) mientras que la afinidad general puede cambiarse (afectando la afinidad de equilibrio) en este proceso o permanecerá igual (afectando a la cinética de unión pero no a la afinidad), cambiando así la cinética de la interacción del polipéptido como se divulga en el presente documento con el antígeno.

El término "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, el dominio o dominios de unión a antígeno de un polipéptido tal como los dominios variables de una cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas en un scFv) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en este documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, un polipéptido de unión a antígeno y su antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y generalmente puede representarse por la constante de disociación en equilibrio (K_D). La afinidad se puede medir por métodos comunes conocidos en la técnica (por ejemplo, medición de Biacore^{MR} y calculada a partir de las constantes de asociación y disociación).

Los términos "regulación", "modulación", "que afecta", "influencia" y "cambio" en el contexto de la regulación/modulación/que afecta/influencia/cambio de la unión del polipéptido como se divulga en el presente documento a su antígeno se pueden usar indistintamente. La regulación de la unión como se usa en este documento significa un cambio de conformación o entropía en el enlazador de calmodulina del polipéptido entre los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, por ejemplo, las regiones V_H y V_L de un fragmento scFv, desencadenadas por el contacto del enlace de calmodulina con una molécula de unión a calmodulina y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM que afectan la conformación del sitio de unión de antígeno, lo que resulta en un cambio (medible) de la unión. El cambio de la unión puede ser una reducción (disminución) de la unión o una mejora (un aumento) de la unión o un cambio de las constantes de la velocidad de disociación o asociación del polipéptido como se divulga en este documento a su antígeno.

La unión de i) una molécula de unión a la calmodulina y ii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina como se usa en este documento tiene que ser una unión concertada, es decir, ambos componentes tienen que estar unidos a la CaM del polipéptido para afectar la modulación de dicha unión. En una realización de la invención, los iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina y el polipéptido de la invención pueden estar presentes en la misma solución (que no es suficiente para inducir la modulación de dicha unión) pero no antes de la adición de una molécula de unión a CaM conducirá a la modulación de la unión del polipéptido como se divulga en el presente

documento (como ahora una unión concertada de ambas, una molécula de unión a calmodulina y la unión de iones al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina a dicho polipéptido es posible).

El término "polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas se enlazan a través de dicha calmodulina" como se usa en este documento se refiere a un polipéptido que tiene los siguientes dominios en el orden de: un primer dominio de superfamilia de inmunoglobulinas, calmodulina, un segundo dominio de la superfamilia de inmunoglobulinas. Preferiblemente, el enlace entre todas estas secuencias parciales (o dominios) es a través de enlaces peptídicos que dan como resultado una secuencia continua de aminoácidos del polipéptido. Alternativamente, el polipéptido puede ser un polipéptido que tiene dichos dominios (péptidos) en el orden mencionado anteriormente, pero la conexión entre uno, más o todos estos dominios (péptidos) puede ser por enlaces covalentes o no covalentes distintos del enlace peptídico, por ejemplo, un puente disulfuro (enlace S-S) entre dos dominios, como un primer puente disulfuro entre un dominio V_H y la calmodulina y un segundo puente disulfuro entre un dominio V_L y la calmodulina. El polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas también se puede ensamblar en parte o completamente mediante métodos de ensamblaje de proteínas utilizando Sortasa, Péptido Ligasa, empalme de proteínas u otros métodos bien conocidos en la técnica para conectar dominios de proteínas en base a secuencias de reconocimiento adecuadas o etiquetas (véase, por ejemplo, van Vught R et al., *Comput Struct Biotechnol J.*, febrero 14 de 2014; 9: e201402001). El polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas también se puede ensamblar en parte o completamente mediante enlaces químicos formados por química CLICK después de la inserción recombinante de aminoácidos no naturales en dichos dominios de proteínas usando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Maruani A et al., *Org Biomol Chem.*, julio 14 de 2016; 14 (26): 6165-78). En una realización, el enlace se puede lograr produciendo un polipéptido a partir de un gen ensamblado usando sistemas de producción recombinantes apropiados. En una realización, esta producción se puede lograr transformando células bacterianas o eucariotas con un vector de expresión apropiado. En otra realización, el enlace se puede lograr formando uno o más enlaces covalentes adecuados entre uno o ambos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas y la calmodulina. En este caso, los dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas y la calmodulina pueden producirse mediante diferentes métodos conocidos y enlazarse después de la producción. En una realización, esta producción se puede lograr transformando células bacterianas o eucariotas con vectores de expresión apropiados para producir los fragmentos separados. En una realización, esta producción se puede lograr mediante síntesis de péptidos.

El término "molécula de unión a la calmodulina", como se usa en este documento, se refiere a cualquier molécula que puede unirse a la calmodulina y que puede desencadenar un cambio conformacional o de estabilidad en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de CaM lo que resulta en la modulación de la unión del polipéptido como se divulga en el presente documento. Dicha molécula de unión a CaM no es parte del polipéptido como se divulga en el presente documento, es una molécula libre que puede unirse a dicho polipéptido a través de los sitios de unión de la calmodulina a dicha molécula de unión a CaM. Dicha molécula de unión a calmodulina puede ser un péptido de unión a calmodulina. Dicho péptido de unión a CaM puede ser un péptido M13 derivado de la quinasa de cadena ligera de la miosina o una variante de la misma. Alternativamente, dicho péptido de unión a CaM puede ser otro péptido diferente al péptido M13, or ejemplo, otro péptido de origen natural o péptido generado sintéticamente. Dicho péptido de unión a calmodulina puede seleccionarse del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 65. Preferiblemente, dicho péptido de unión a calmodulina puede seleccionarse del grupo de péptidos que consiste en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51 y ID SEC NO: 53.

Pero en general, se puede usar cualquier péptido o polipéptido que pueda unirse a CaM.

Se dispone de estructuras tridimensionales de calmodulina en complejo con sustratos peptídicos de alta afinidad (Montigiani et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 258: 6-13). Estos péptidos corresponden a las regiones de unión a la calmodulina de diferentes proteínas quinasas. Alternativamente, se pueden usar métodos tales como el despliegue en fagos peptídicos para identificar secuencias adicionales que pueden unirse a la calmodulina y causar el cambio de conformación.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describe con más detalle y específicamente con referencia a los ejemplos, que, sin embargo, no pretenden limitar la presente invención.

Ejemplo 1: Generación de fusiones de calmodulina permutada-scFv

Para identificar la disposición óptima de la calmodulina para lograr el efecto de un cambio de conformación que afecta la unión del anticuerpo cuando se inserta entre las regiones de unión a antígeno V_H y V_L de un anticuerpo, se generó una biblioteca de genes de 152 variantes diferentes que representan todos los puntos de inserción posibles a través de una molécula de calmodulina circularizada.

En primer lugar, el gen que codifica la calmodulina humana (SEQ ID NO: 66) se optimizó para la expresión recombinante en *E. coli*, se añadieron secuencias de flanqueo que codifican para sitios de reconocimiento de *Bam*HI

y se sintetizó el constructo mediante DNA2.0 (Menlo Park, EE. UU.). La permutación circular del gen se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 1). Primero, el plásmido que porta el gen de interés se amplificó en NEB® 5-alpha de *E. coli* (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Alemania) y se purificó utilizando el kit de purificación de plásmidos de NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). A continuación, el gen que codifica la calmodulina se eliminó del plásmido por restricción con *Bam*HI (todas las enzimas se obtuvieron a través de New England Biolabs, Frankfurt a.M, Alemania, si no se indica lo contrario), electroforesis en gel y extracción del fragmento utilizando el gel NucleoSpin® y el Kit de limpieza de PCR (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Posteriormente, el fragmento se circularizó por ligación con ADN ligasa T4 (incubación durante la noche a 16°C). La concentración de ADN no superó los 2,5 ng/μL en la mezcla de reacción para evitar la formación de multímeros. La reacción se detuvo mediante incubación a 65°C durante 10 minutos y las formas circulares se aislaron mediante electroforesis en gel y extracción con gel. El fragmento de ADN circularizado se usó como plantilla para la generación de variantes permutadas por PCR. Se diseñaron 152 pares de oligonucleótidos diferentes (obtenidos a través de Metabion, Planegg/Steinkirchen, Alemania) para la amplificación de todas las posibles variantes permutadas de calmodulina. Los oligonucleótidos directos contenían secuencias superpuestas que codificaban los sitios de reconocimiento de *Nhe*I, mientras que los oligonucleótidos inversos incluían salientes que codificaban los sitios de restricción de *Eco*RV para facilitar la clonación de los productos de la PCR en el vector objetivo. La PCR se realizó con ADN Polimerasa Phusion® High-Fidelity como se indica en el manual del fabricante. El tamaño de los productos se verificó mediante electroforesis en gel y la mezcla de reacción restante se desalinizó utilizando el Gel NucleoSpin® y el kit de limpieza de PCR, seguido de restricción con *Nhe*I y *Eco*RV. La reacción se detuvo mediante incubación a 80°C durante 20 min y se utilizó directamente para ligación en la cadena principal del vector, que se había tratado por igual con *Nhe*I y *Eco*RV y luego se purificó mediante electroforesis en gel y extracción. La ligadura parcial del extremo romo se realizó con ADN ligasa T4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la incubación durante la noche a 16°C, la reacción se detuvo (65°C, 10 min) y se transformó directamente en la cepa de expresión *E. coli* W3110 utilizando protocolos estándar. Los clones positivos se identificaron mediante PCR de colonias utilizando ADN polimerasa REDTaq® (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) y secuenciación (GATC Biotech, Colonia, Alemania).

De los 152 productos de PCR diferentes resultantes, 145 pudieron clonarse exitosamente como un enlazador en el scFv de unión a lisozima (D1.3 scFv-TS sin enlazador de CaM: SEQ ID NO: 135).

Ejemplo 2: Identificación de variantes de scFv-calmodulina anti-lisozima intercambiables

Se ha demostrado que la conformación de la calmodulina cambia cuando se une al péptido M13 de unión a la calmodulina (residuos 577-602 de la quinasa de cadena ligera de la miosina del músculo esquelético). Para probar la influencia del péptido M13 en las proteínas de fusión calmodulina-scFv, todos los constructos se produjeron en *E. Coli* en formato de placa de microtitulación.

Las células que albergan el constructo deseado se cultivaron durante la noche a 37°C y 1.000 rpm en placas de polipropileno con fondo en U de 96 pozos (Greiner Bio-One, Solingen, Alemania) en 180 μL de medio YP-GK 2x (medio YP 2x [16 g L⁻¹ de peptona de soja, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g L⁻¹ de NaCl, pH 7,0] que contiene glucosa 100 mM y 50 μg/mL de kanamicina) por pozo. Al día siguiente, se inocularon 170 μL de medio fresco con 5 μL de cultivo durante la noche y se agitaron a 1.000 rpm durante 6 horas a 30°C. La expresión de proteínas se indujo con una concentración final de IPTG 0,2 mM y los cultivos se incubaron durante la noche a 25°C. Las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (4.000 g, 20 min, 4°C) y se almacenaron a -20°C o se procesaron directamente para la detección del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Para la extracción periplasmática de la proteína objetivo, los sedimentos se resuspendieron en 100 μL de regulador TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM; pH 9,0) por pozo y se agitaron durante 2 horas a 37°C y 1.000 rpm. La proteína que contenía el sobrenadante se separó de las células mediante centrifugación (4.000 g, 20 min, temperatura ambiente) y se usó directamente para ELISA.

Se identificaron variantes de scFv-CaM D1.3 que muestran propiedades de unión modificadas hacia el antígeno (lisozima) en presencia de péptido M13 mediante ELISA competitivo. Se recubrieron 100 ng de lisozima en placas de ELISA Nunc MaxiSorp® de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) en solución salina 1x regulada con tris (TBS) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM; pH 8,0) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con TBST 1x (TBS 1x + Tween® 20 al 0,05% [v/v]; pH 8,0) y luego se bloquearon con B-TBS 1x (TBS 1x + albúmina de suero bovino al 1% [p/v]; pH 8,0) durante al menos 1 hora a temperatura ambiente. Los lisados crudos de la expresión de la placa de microtitulación se diluyeron 1:10 en B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM (preparación A) o B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM/ péptido M13 1 μM (Anaspec, Fremont, EE. UU.) (preparación B). Los scFv purificados también se diluyeron en los reguladores mencionados a concentraciones apropiadas (0,1 μM). Los scFv diluidos se incubaron previamente en placas de polipropileno de 96 pozos (Greiner Bio-One, Solingen, Alemania) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se transfirieron 100 μL de la solución de proteína a las placas de ELISA bloqueadas y lavadas (tres veces con TBST 1x). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1,5 h, las placas se lavaron de nuevo (tres veces con TBST 1x) y se agregó el anticuerpo anti-His conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (diluido 1:10.000 en B-TBS 1x, 100 μL por pozo; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para la detección de fusiones de scFv unidas. Después de otra etapa de lavado, la visualización de los complejos de anticuerpos unidos se realizó mediante la adición de 100 μL de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) (Seramun Diagnostica, Heidesee, Alemania) por pozo. La reacción se detuvo con 100 μL de H₂SO₄ 0,5 M y se midió la absorbancia (450 nm) con un lector de microplacas de ELISA Versamax® (Molecular Devices, Sunnyvale, EE. UU.). Casi todos los constructos mostraron una señal de unión más baja en presencia del péptido M13 (FIG. 2; la proporción

superior a 1 correspondió a scFv que mostró una señal de unión más baja en presencia del péptido M 13), mientras que no se observaron cambios en la señal para el control de tipo silvestre (TS) ([G₄S]₃-enlazador). Las mayores diferencias en las intensidades de señal se observaron alrededor de tres regiones de la cadena de calmodulina: cerca del extremo terminal N o del extremo terminal C, y alrededor del aminoácido 80. Las dos fusiones de cada una de estas tres regiones de permutación con la mayor diferencia de unión (llamadas N-1+2, M-1+2, C-1+2, respectivamente), así como la variante de CaM no permutada (es decir, fusionadas por sus extremos terminales N/C, llamados lin) se usaron para análisis adicionales. Estos resultados confirmaron que la calmodulina insertada en la posición del enlazador entre las regiones V del anticuerpo D1.3 puede inducir una influencia dependiente del péptido M13 en la unión del antígeno. Los puntos de inserción son permisivos en varias posiciones de aminoácidos diferentes, pero se agrupan principalmente alrededor de la posición de los extremos terminales de tipo silvestre o en la mitad del polipéptido calmodulina.

Ejemplo 3: Evaluación de las características de liberación dependientes del péptido M13 de las fusiones de scFv unidas

El cambio de unión mediado por calmodulina observado en la detección inicial se logró después de la preincubación con el modulador M13. A continuación, se diseñó un ELISA de liberación para probar si la unión del péptido M13 a los enlazadores de calmodulina también puede inducir la disociación de un complejo antígeno-anticuerpo ya establecido. Después de una fase de unión inicial de variantes de scFv en antígeno en un regulador que contiene calcio, se agregó el péptido M13, con un regulador de solo calcio utilizado para control. En paralelo, los mismos scFv se analizaron mediante el enfoque competitivo de preincubación descrito anteriormente (comparar con el Ejemplo 2) en la misma placa para la calibración.

En primer lugar, las constructos scFv-CaM se produjeron en una escala de matraz de agitación de 500 mL. Para la expresión de proteínas, las células que albergan el constructo deseado se cultivaron durante la noche a 37°C y 250 rpm en 30 mL de medio YP-GK 2x (medio YP 2x [16 g L⁻¹ de peptona de soja, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g L⁻¹ de NaCl, pH 7,0] que contiene 100 mM de glucosa y 50 µg/mL de kanamicina). Al día siguiente, se inocularon 500 mL de medio fresco hasta una OD₆₀₀ de 0,1 y se agitaron en matraces de agitación de 2 L (37°C, 250 rpm) hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ de 1,0. La expresión de la proteína se indujo con una concentración final de IPTG 0,2 mM y los cultivos se incubaron adicionalmente a 25°C durante 4 h. Las bacterias se recogieron por centrifugación (4.000 g, 20 min, 4°C) y el sedimento bacteriano se procesó directamente o se almacenó a -20°C hasta la extracción periplasmática y la purificación de proteínas.

Para la purificación de las constructos de scFv, el sedimento bacteriano se resuspendió en 10 mL de regulador TE por g de sedimento (Tris 100 mM, EDTA 10 mM; pH 9,0 o pH 7,4, dependiendo del punto isoelectrico de la fusión de scFv) y se incubó durante la noche a 37°C a 250 rpm. Al día siguiente, se añadió la nucleasa Benzonasa® (concentración final: 1 U/mL; Merck, Darmstadt, Alemania) y MgCl₂ (20 mM) para la eliminación del ADN. Además, se añadió el cóctel inhibidor de la proteasa Halt^{MR} (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) para evitar la degradación de la proteína objetivo. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y 250 rpm. Posteriormente, la proteína que contenía el sobrenadante se separó de los residuos celulares mediante centrifugación (5.000 g, 20 min, temperatura ambiente) y se preparó para la purificación mediante la adición de regulador de dilución 11x (Tris 110 mM, NaCl 550 mM, Imidazol 55 mM; pH 9,0 o pH 7,4). Se equilibraron 250 µL de resina de níquel Sefarosa^{MR} 6 (GE Healthcare, Solingen, Alemania) con 10 volúmenes de columna (CV) de regulador de lavado 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 5 mM; pH 9,0 o pH 7,4) en columnas de cromatografía Poly-Prep® (Bio-Rad, Múnich, Alemania) y luego se cargaron con el sobrenadante periplasmático, seguido de lavado con 30 CV de regulador de lavado 1 y 15 CV de regulador de lavado 2 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 25 mM; pH 9,0 o pH 7,4). La proteína se eluyó con 5 CV de regulador de elución 1 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 50 mM, imidazol 150 mM; pH 9,0 o pH 7,4) y 5 CV de regulador de elución 2 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 50 mM, imidazol 350 mM; pH 9,0 o pH 7,4). Las fracciones que contenían proteína objetivo se agruparon y se dializaron a 4°C frente a 200 volúmenes de solución salina regulada con Tris 1x (TBS) (Tris 50 mM, NaCl 150 mM; pH 8,0) durante 2 h, seguido de otra diálisis contra regulador fresco (200 volúmenes) durante 2 h. La diálisis final se realizó durante la noche a 4°C frente a 500 volúmenes de regulador. La concentración de proteína se determinó con el kit de ensayo de proteína Coomassie Pierce^{MR} (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y luego se utilizó para ELISA competitivo y de liberación.

El ELISA competitivo se realizó como se divulga en el Ejemplo 2. El ELISA de liberación difería del ELISA competitivo solo en la etapa de preincubación y se realizó una etapa de liberación adicional para evaluar si los fragmentos de anticuerpo ya unidos se disocian del antígeno en presencia del péptido M13. Los scFv purificados para ambas preparaciones (preparación A y preparación B) se diluyeron a las concentraciones apropiadas (0,1 µM) en B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM y se transfirieron directamente (es decir, sin etapa de preincubación en placas de polipropileno) a las placas de ELISA bloqueadas. Después de la unión inicial de los scFv (1,5 h, temperatura ambiente), las placas se lavaron (tres veces con TBST 1x) y se añadieron diferentes reguladores de liberación. Para el control (preparación A), los pozos se llenaron con 100 µL de B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM, mientras que se añadió B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM/péptido M13 1 µM en la preparación B. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas fueron tratadas de manera comparable al ELISA competitivo.

La absorbancia se midió y se normalizó, donde la señal obtenida para el control de tipo silvestre (indicado por rombos negros) en un regulador que contenía calcio se ajustó al 100%. Los resultados de la media de cuatro experimentos (n

= 4) se muestran en la Figura 3, donde las barras de error indican la desviación estándar. La caída de afinidad en presencia de péptido en la preparación de liberación (Figura 3B) fue comparable a la caída observada en el enfoque de preincubación (Figura 3A). La mayor disminución en la señal se observó para las variantes con los enlazadores de CaM permutados en el extremo terminal C (C-1, C-2) y la variante M-1. Por lo tanto, el uso de estas variantes de CaM permutadas fue ventajoso sobre el enlazador de CaM lineal (es decir, no permutado). En conjunto, estos resultados indicaron que se logró una liberación específica de la fusión scFv-CaM de su antígeno mediante la adición del péptido M13, lo que indica una pérdida de unión.

Ejemplo 4: Evaluación del comportamiento de unión dependiente del péptido M13 específico de las fusiones scFv-CaM anti-lisozima

10 Para evaluar si la modulación de la unión de las variantes scFv-CaM de D1.3 es específica, se determinó la unión de una cantidad definida de scFv (0,1 μ M) en función de las concentraciones crecientes de péptido M13 en presencia de calcio. Se realizó una titulación de control en un regulador que contiene EDTA para evaluar cualquier efecto independiente del calcio del péptido M13.

15 La producción y purificación de diferentes fusiones de scFv se realizó como se divulga en el Ejemplo 3. El ELISA de titulación difería del ELISA competitivo (descrito en el Ejemplo 2) solo en la composición de regulador utilizada para la preincubación. De la columna 11 a 2, la concentración de péptido M13 se diluyó secuencialmente (factor de dilución: 1: 2) en TBS 1x/CaCl₂ 5 mM (concentración más alta en la columna 11: 3,2 μ M; concentración más baja en la columna 2: 6,25 nM; control en la columna 1: 0 nM). Para la evaluación de si la interacción entre la calmodulina y el péptido M13 depende del calcio, la valoración se realizó adicionalmente en B-TBS 1x/EDTA 5 mM. Casi todas las variantes de scFv-CaM analizadas mostraron una disminución dependiente del calcio en la unión del antígeno al aumentar la concentración de péptido. A una concentración de péptido M13 0,1 μ M, una relación molar de 1:1 (indicada por flechas), no se observó una pérdida adicional de la señal de unión (FIG. 4B, C, E, F, G, H, triángulos sin relleno). Solo la variante M-2 no mostró esta tendencia (FIG. 4D) y se comportó de manera similar al control de tipo silvestre (FIG. 4A). La variante del extremo terminal C (FIG. 4G, H) y la M-1 (FIG. 4C) proporcionaron la disociación más fuerte, corroborando los resultados mostrados en la FIG. 3. En los controles con EDTA, el aumento de las concentraciones de péptido M13 no tuvo una influencia en la absorbancia medida (FIG. 4A, B, C, D, E, F, G, H, cuadrados rellenos). Sin embargo, la unión global de antígeno/scFv-CaM se vio claramente afectada por la presencia de EDTA, ya que las señales de unión obtenidas en la preparación de EDTA fueron mucho más bajas que las correspondientes con calcio.

25 En resumen, seis de las siete fusiones scFv-CaM analizadas mostraron una unión al antígeno dependiente del péptido M13, con una pérdida máxima de unión a una relación molar de 1:1 de péptido M13:scFv.

Ejemplo 5: Función de la actividad del enlazador CaM en otros anticuerpos scFv

30 Para investigar si los enlazadores identificados para proporcionar la modulación de la unión en scFv D1.3 se pueden usar como un módulo "universal" para cambiar las propiedades de unión en otros fragmentos scFv distintos de D1.3, las variantes caracterizadas del enlazador CaM se clonaron en otros anticuerpos scFv con diferentes especificidades. Las especificidades se eligieron de acuerdo con su utilidad en futuras aplicaciones de tinción y separación celular, con dos scFv dirigidos contra diferentes grupos de diferenciación humanos (CD14, CD4) y la pequeña hapteno-biotina. Para identificar las variantes de scFv-CaM dependientes del péptido M13 para esas especificidades, se tiñeron células sanguíneas humanas (PBMC) usando scFv purificados y se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo. Los scFv unidos se detectaron con anticuerpos anti-His marcados con fluorescencia. Los protocolos de incubación para el análisis de citometría de flujo fueron comparables al ELISA de preincubación, con reguladores que incluyen y no péptido M13.

35 La producción y purificación de diferentes fusiones de scFv se realizó como se divulga en el Ejemplo 3. Todos los anticuerpos y reactivos de tinción utilizados para aplicaciones de citometría de flujo fueron de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania). Para las tinciones con variantes de scFv anti-biotina, las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se tiñeron previamente con los conjugados de IgG apropiados. Las tinciones se realizaron en microtubos de 1,5 mL. Se incubaron 1×10^6 PBMC por muestra en hielo durante 10 min en 110 μ L de B-TBS 1x (TBS 1x + albúmina de suero bovino al 0,5% [p/v]) + CaCl₂ 5 mM (pH 7,4) que contenía anti-CD14-biotina (dilución: 1:11). La reacción se detuvo mediante la adición de 1 mL de regulador y centrifugación a 300 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó completamente y el sedimento se almacenó en hielo y se resuspendió en regulador inmediatamente antes de la siguiente etapa de tinción. Las siguientes tinciones se realizaron en placas de polipropileno de 96 pozos. Los scFv purificados se diluyeron a concentraciones apropiadas en 50 μ L de B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM (pH 7,4 [anti-biotina] o pH 8,0 [anti-CD14, anti-CD4]) por pozo. Para las pruebas de detección competitivas, se agregó péptido (péptido M13 [Anaspec, Fremont, EE. UU.], biblioteca de variantes de M13 y biblioteca de CBP (péptido de unión a calmodulina) [Genscript, Piscataway, EE. UU.]) en exceso molar en un volumen total de 5 μ L por pozo, mientras que las tinciones de control se suministraron con 5 μ L de B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM. Los scFv diluidos se incubaron previamente durante 45 min a temperatura ambiente y después se enfriaron en hielo durante 5 min. Después de la adición de 2×10^5 células (en 45 μ L de B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM) y la incubación durante 20 min en hielo, los pozos se llenaron con regulador hasta un volumen de 285 μ L y se centrifugaron a 300 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente, las células se resuspendieron en 110 μ L de B-TBS 1x/CaCl₂ 5 mM que contenía anti-His-PE (ficoeritrina) (dilución: 1:11), se incubaron en hielo durante 10 minutos, seguidas de una etapa de lavado adicional y finalmente se

resuspendieron en 200 μ L de regulador. El análisis se realizó en un analizador MACSQuant® 10 en modo de bastidor 96 con enfriamiento con adición automática de solución de yoduro de propidio para la exclusión de células muertas (concentración final: 1 μ g/mL). Un total de 10.000 eventos fueron recolectados para cada muestra.

5 La mayor disminución dependiente del péptido M13 en la intensidad de fluorescencia se obtuvo para las variantes de scFv-CaM anti-CD14 (Figura 5A, primera fila). En el caso de scFv anti-biotina (Figura 5A, segunda fila), dos variantes enlazadoras (M-1, M-2) dieron como resultado una alta disminución dependiente del péptido de la señal de unión, aunque se observó una ligera disminución para el resto clones también (lin, N-1, N-2). Curiosamente, las variantes permutadas en el extremo terminal C (C-1, C-2) condujeron al comportamiento de cambio opuesto con un aumento en las intensidades de fluorescencia. La misma tendencia se monitorizó para tres scFv anti-CD4 (M-1, C-1, C-2),
10 mostrando un aumento de señal aún mayor que las variantes de scFv anti-biotina (Figura 5A, tercera fila) tras la incubación del péptido M13.

Las Figuras 5B, C y D muestran la relación de las señales de alta unión en comparación con las señales de baja unión. Las intensidades de fluorescencia modal altas se dividieron por las intensidades de fluorescencia modal bajas. Una proporción de 1 (indicada por una línea discontinua) correspondía a un anticuerpo no conmutable. Estas cifras
15 muestran que el uso de variantes de CaM permutadas dio como resultado un anticuerpo altamente conmutable en todas las especificidades. En contraste con eso, la variante lineal proporcionó solo un fragmento de anticuerpo altamente conmutable (scFv anti-CD14) (FIG. 5B), ya que el scFv anti-biotina generado (FIG. 5C) solo mostró una ligera disminución en la señal de unión y el scFv anti-CD4 no mostró ningún cambio (FIG. 5D). En general, el uso de enlazadores de calmodulina permutados, preferiblemente de variantes permutadas en el extremo terminal C o permutados en el medio del gen anterior codificador de calmodulina, condujo a un cambio mayor en la señal de unión
20 que el enlazador de calmodulina lineal. Además, se analizaron dos especificidades adicionales de acuerdo con su comportamiento de cambio, las fusiones scFv-CaM anti-CD20 y las variantes scFv-CaM anti-FITC (isotiocianato de fluoresceína). Para los scFv anti-CD20, se observó una ligera disminución dependiente del péptido de la señal de unión para todas las variantes de CaM, mientras que ninguna de las variantes de scFv-CaM anti-FITC probadas mostró un cambio en el comportamiento de unión (datos no mostrados). En resumen, se ha demostrado que el mecanismo de modulación de la unión a través de una combinación de enlazador de calmodulina/péptido M13 podría transferirse a cuatro de las cinco especificidades de anticuerpos analizadas. Además, el uso de enlazadores CaM permutados fue ventajoso sobre la variante de CaM lineal.
25

Ejemplo 6: Identificación de péptidos de unión a calmodulina adicionales con propiedades moduladoras de unión

30 La calmodulina se une a una variedad de compañeros de unión. Para investigar si otros péptidos de unión a calmodulina o mutantes derivados de M13 son capaces de modular las propiedades de unión de las fusiones scFv-CaM, se realizó una selección de péptidos. Por un lado, se analizaron 38 variantes mutadas del péptido M13, por ejemplo, mutantes de unión que se sabe que tienen afinidades más altas por calmodulina, variantes truncadas y combinaciones de los mismos. Además, se analizaron 29 péptidos derivados de otras proteínas de unión a la calmodulina como la ATPasa de calcio, la espectrina y la oxidasa sintasa nítrica con respecto a las posibles
35 propiedades moduladoras de la unión. El análisis se realizó a través de la tinción competitiva de PBMC como en los experimentos anteriores descritos en el Ejemplo 5. La selección completa (es decir, de las bibliotecas de péptidos completos) se realizó con 4 variantes de enlazadores diferentes de scFv anti-CD14 (lin, M-2, N-1, C-1) y scFv anti-CD4 (lin, M-1, N-1, C-1). El tipo silvestre de cada especificidad se usó como control. Las 38 variantes mutadas del péptido M13 mostraron propiedades moduladoras de la afinidad, mientras que 24 de 29 péptidos analizados derivados de proteínas de unión alternativas a la calmodulina dieron como resultado un cambio en la señal de unión en al menos una fusión scFv-CaM analizada (Figura 6A (variantes del péptido M13) y la Figura 6B (péptidos de unión a calmodulina); solo se incluyen en la figura los péptidos que modulan al menos una variante de scFv). La mayoría de los péptidos probados mostraron un efecto comparable al péptido M13 o una influencia ligeramente menor. Nos centramos en las variantes peptídicas, que llevaron a una disminución o aumento de la señal aún mayor que M13 y se analizaron todas las fusiones scFv-CaM de scFv anti-CD 14, anti-biotina y anti-CD4 (FIG. 7A, B, C). Para scFv anti-CD14, tres variantes diferentes del conocido mutante de alta afinidad de M13 dieron como resultado una mayor
40 disminución de la señal en los clones permutados en medio de CaM y el clon lineal (FIG. 7A, M13-Var5/6/7). CBP-Var8, un derivado de la espectrina, condujo a una disminución ligeramente mayor en la variante lineal permutada en el extremo terminal C y en la variante lineal (FIG. 7A, CBP-Var8). Inesperadamente, un péptido derivado de la ATPasa transportadora de calcio (CBP-Var16) resultó en un aumento de la señal de fluorescencia en las variantes M-2 y C-2 (FIG. 7A, CBP-Var16). Se monitorizó el mismo comportamiento opuesto para los clones permutados en el extremo terminal C de scFv anti-CD4, donde el péptido M13 condujo a un aumento en la señal de unión, mientras que CBP-Var16 produjo una disminución inesperada en la intensidad de la fluorescencia (FIG. 7C, CBP-Var16). Dos fusiones scFv-CaM anti-biotina (M-1, M-2) mostraron tal comportamiento de cambio opuesto en presencia de CBP-Var6, otro derivado de la ATPasa transportadora de calcio (FIG. 7B, CBP-Var6). Sorprendentemente, CBP-Var16 tuvo un efecto cada vez mayor en el clon C-1 y no mostró un comportamiento de cambio opuesto como en las otras fusiones scFv-CaM (FIG. 7B, CBP-Var16). Lo mismo se observó para las variantes de scFv M anti-CD4, donde CBP-Var6 condujo a un aumento adicional en la intensidad de fluorescencia (FIG. 7C, CBP-Var6). Además, un péptido derivado de la
45 oxidasa sintasa nítrica endotelial (CBP-Var12) tuvo el mismo efecto en las fusiones scFv-CaM anti-CD4 permutadas en el extremo terminal C (FIG. 7C, CBP-Var12). Se observó otra disminución inesperada en la señal de unión para el clon de scFv anti-CD4 lineal, desencadenado por CBP-Var10, derivado del receptor de glutamato ionotrópico NMDA1, aunque el péptido M13 no tuvo ninguna influencia en absoluto (FIG. 7C, CBP-Var10). En resumen, se ha demostrado
60

que la mayoría de los péptidos de unión a calmodulina probados condujeron a una modulación de la unión en las fusiones scFv-CaM. Se identificaron algunos candidatos que resultaron en una disminución o aumento aún mayor de la señal de enlace que la variante de tipo silvestre de M13. Además, algunos péptidos dieron como resultado un comportamiento de cambio opuesto inesperado.

5 Listado de secuencias

<110> Miltenyi Biotec GmbH

<120> Composición y Método para afectar la unión de polipéptidos de unión a antígeno a antígenos

<130> Mil_096

<160> 135

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> péptido M13 (TS, L); péptido de proteína de Oryctolagus cuniculus

<400> 1

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala Leu
20 25

<210> 2

20 <211> 25

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido M13 (TS, S); péptido de proteína de Oryctolagus cuniculus

25 <400> 2

Lys Arg Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg
1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Ser Ser Gly Ala
20 25

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

30 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido M13 (TS, XS); péptido de proteína de Oryctolagus cuniculus

ES 2 708 657 T3

<400> 3

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 4

5 <211> 18

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var2

10 <400> 4

Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ser

<210> 5

<211> 18

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var3

<400> 5

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile

20 <210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var4

<400> 6

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys

ES 2 708 657 T3

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> M13-Var5

<400> 7

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 8

10 <211> 18

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var6

15 <400> 8

Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys Lys
1 5 10 15

Ile Ser

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var7

<400> 9

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile

25 <210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

30 <223> M13-Var8

ES 2 708 657 T3

<400> 10

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys

<210> 11

5 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var9

10 <400> 11

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var10

<400> 12

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Lys Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

20 <210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var11

<400> 13

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> M13-Var12

<400> 14

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 15

<211> 19

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var13

<400> 15

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Lys Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

15

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> M13-Var14

<400> 16

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Lys Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 17

25 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var15

ES 2 708 657 T3

<400> 17

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Lys Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 18

5 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var16

10 <400> 18

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var17

<400> 19

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Lys Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

20 <210> 20

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var18

<400> 20

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 21

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> M13-Var19

<400> 21

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 22

<211> 19

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var20

<400> 22

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Lys Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> M13-Var21

<400> 23

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Lys Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 24

25 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var22

ES 2 708 657 T3

<400> 24

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 25

5 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var23

10 <400> 25

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Lys Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 26

<211> 19

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var24

<400> 26

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Ala Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

20 <210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var25

<400> 27

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Ala Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 28

ES 2 708 657 T3

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> M13-Var26

<400> 28

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Lys Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 29

<211> 19

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var27

<400> 29

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Ala Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

15

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> M13-Var28

<400> 30

Arg Trp Lys Lys Ala Ile Ile Ala Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 31

25 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var29

ES 2 708 657 T3

<400> 31

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Lys Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 32

5 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var30

10 <400> 32

Arg Trp Lys Lys Ala Phe Ile Lys Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 33

<211> 19

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var31

<400> 33

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Lys Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

20 <210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var32

<400> 34

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Lys Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 35

ES 2 708 657 T3

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> M13-Var33

<400> 35

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Ala Val Leu Ala Ile Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 36

<211> 19

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var34

<400> 36

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Ala Val Leu Ala Ala Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

15

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> M13-Var35

<400> 37

Arg Trp Lys Lys Asn Ile Ile Ala Val Ser Ala Ile Asn Arg Phe Lys
1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 38

25 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var36

ES 2 708 657 T3

<400> 38

Arg Trp Lys Lys Asn Asp Ile Ala Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 39

5 <211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var37

10 <400> 39

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Asp Val Ser Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 40

<211> 19

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> M13-Var38

<400> 40

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val His Ala Ala Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

20 <210> 41

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> M13-Var39

<400> 41

Arg Trp Lys Lys Asn Phe Ile Ala Val Ser Ala Arg Asn Arg Phe Lys

1 5 10 15

Lys Ile Ser

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> CBP-Var2; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 42

Gly Val Arg Asn Ile Lys Ser Met Trp Glu Lys Gly Asn Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 43

<211> 20

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var3; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 43

Ala Arg Arg Lys Leu Lys Ala Ala Val Lys Ala Val Val Ala Ser Ser
 1 5 10 15

Arg Leu Gly Ser
 20

15

<210> 44

<211> 25

<212> PRT

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> CBP-Var4; péptido de proteína de Oryctolagus cuniculus

<400> 44

Phe Met Asn Asn Trp Glu Val Tyr Lys Leu Leu Ala His Ile Arg Pro
 1 5 10 15

Pro Ala Pro Lys Ser Gly Ser Tyr Thr
 20 25

<210> 45

25 <211> 24

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var5; péptido de proteína de Rattus norvegicus

ES 2 708 657 T3

<400> 45

Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met
1 5 10 15

Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg
20

<210> 46

5 <211> 24

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var6; péptido derivado de proteína de Gallus gallus

10 <400> 46

Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn Arg Ile Gln Thr Gln
1 5 10 15

Ile Lys Val Val Asn Ala Phe Ser
20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var8; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 47

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

Ala Thr Phe Asn Ser Ile Lys Glu
20

20 <210> 48

<211> 25

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> CBP-Var9; péptido de proteína de Mus musculus

<400> 48

ES 2 708 657 T3

Lys Lys Lys Lys Lys Arg Phe Ser Phe Lys Lys Ser Phe Lys Leu Ser
1 5 10 15

Gly Phe Ser Phe Lys Lys Ser Lys Lys
20 25

<210> 49

<211> 24

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var10; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 49

Lys Lys Lys Ala Thr Phe Arg Ala Ile Thr Ser Thr Leu Ala Ser Ser
1 5 10 15

Phe Lys Arg Arg Arg Ser Ser Lys
20

10 <210> 50

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> CBP-Var11; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 50

Lys Arg Arg Ala Ile Gly Phe Lys Lys Leu Ala Glu Ala Val Lys Phe
1 5 10 15

Ser Ala Lys Leu Met Gly Gln
20

<210> 51

<211> 20

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var12; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 51

Arg Lys Lys Thr Phe Lys Glu Val Ala Asn Ala Val Lys Ile Ser Ala
1 5 10 15

Ser Leu Met Gly
20

25

ES 2 708 657 T3

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> CBP-Var13; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 52

Ala Ala Ala Arg Lys Glu Val Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly

1

5

10

15

Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu

20

25

10 <210> 53

<211> 20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> CBP-Var16; péptido de proteína de Gallus gallus

<400> 53

Leu Arg Arg Gly Gln Ile Leu Trp Phe Arg Gly Leu Asn Arg Ile Gln

1

5

10

15

Thr Gln Ile Lys

20

<210> 54

<211> 17

20 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var18; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 54

Ala Thr Leu Asp Ala Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala

1

5

10

15

25 Asp

<210> 55

<211> 19

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 708 657 T3

<220>

<223> CBP-Var19; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys
1 5 10 15

Lys Asn Ser

5 <210> 56

<211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> CBP-Var20; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 56

Lys Ile Tyr Ala Ala Met Met Ile Met Glu Tyr Tyr Arg Gln Ser Lys
1 5 10 15

Ala Lys Lys Leu Gln
20

<210> 57

<211> 21

15 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var21; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 57

Lys Ile Tyr Ala Ala Met Met Ile Met Asp Tyr Tyr Lys Gln Ser Lys
1 5 10 15

Val Lys Lys Gln Arg
20

20

<210> 58

<211> 21

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> CBP-Var22; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 58

ES 2 708 657 T3

Lys Phe Tyr Ala Thr Phe Leu Ile Gln Glu His Phe Arg Lys Phe Met
1 5 10 15

Lys Arg Gln Glu Glu
20

<210> 59

<211> 24

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var23; péptido derivado de proteína de Homo sapiens

<400> 59

Gly Thr Gly Ala Ala Leu Ser Trp Gln Ala Ala Ile Asp Ala Ala Arg
1 5 10 15

Gln Ala Lys Leu Met Gly Ser Ala
20

10

<210> 60

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

15 <220>

<223> CBP-Var24; péptido derivado de proteína de Oryctolagus cuniculus

<400> 60

His Met Gly Lys Val Tyr Ala Ala Leu Met Ile Phe Asp Phe Tyr Lys
1 5 10 15

Gln Asn Lys Thr Ser Arg Asp
20

<210> 61

20 <211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var25; péptido derivado de proteína de Homo sapiens

25 <400> 61

Gly His Met Gly Lys Ile Tyr Ala Ala Met Met Ile Met Asp Tyr Tyr
1 5 10 15

Lys Gln Ser Lys Val Lys Lys
20

ES 2 708 657 T3

<210> 62

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> CBP-Var26; péptido derivado de proteína de Ovis aries musimom

<400> 62

```

His Met Gly Lys Ile Tyr Ala Ala Met Met Ile Met Glu Tyr Tyr Arg
1           5           10           15
Gln Ser Lys Ala Lys Lys
                20
    
```

<210> 63

10 <211> 25

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var27; péptido de proteína de Homo sapiens

15 <400> 63

```

Ile Lys Lys Asn Phe Ala Lys Ser Lys Trp Lys Gln Ala Phe Asn Ala
1           5           10           15
Thr Ala Val Val Arg His Met Arg Lys
                20           25
    
```

<210> 64

<211> 25

<212> PRT

20 <213> secuencia artificial

<220>

<223> CBP-Var28; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 64

```

Leu Lys Lys Phe Asn Ala Arg Arg Lys Leu Lys Gly Ala Ile Leu Thr
1           5           10           15
Thr Met Leu Ala Thr Arg Asn Phe Ser
                20           25
    
```

25 <210> 65

<211> 22

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 708 657 T3

<220>

<223> CBP-Var30; péptido de proteína de Homo sapiens

<400> 65

Ala Lys Ser Lys Trp Lys Gln Ala Phe Asn Ala Thr Ala Val Val Arg
 1 5 10 15
 His Met Arg Lys Leu Gln
 20

5 <210> 66

<211> 148

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Calmodulina de Homo sapiens (secuencia de TS): lin

<400> 66

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

<210> 67

ES 2 708 657 T3

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

5 <223> variante de calmodulina permutada: M-1

<400> 67

```

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 1          5          10          15

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
          20          25          30

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
          35          40          45

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
          50          55          60

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
65          70          75          80

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe
          85          90          95

Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val
          100          105          110

Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met
          115          120          125

Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu
130          135          140

Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
145          150
    
```

<210> 68

10 <211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: M-2

15 <400> 68

ES 2 708 657 T3

Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
 1 5 10 15

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
 20 25 30

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala
 35 40 45

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met
 50 55 60

Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln
 65 70 75 80

Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp
 85 90 95

Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly
 100 105 110

Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp
 115 120 125

Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met
 130 135 140

Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp
 145 150

<210> 69

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: N-1

<400> 69

ES 2 708 657 T3

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
 1 5 10 15

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
 20 25 30

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
 35 40 45

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp
 50 55 60

Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp
 65 70 75 80

Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
 85 90 95

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
 100 105 110

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala
 115 120 125

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met
 130 135 140

Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly
 145 150

<210> 70

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: N-2

<400> 70

ES 2 708 657 T3

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
 1 5 10 15

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
 20 25 30

Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
 35 40 45

Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe
 50 55 60

Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser
 65 70 75 80

Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn
 85 90 95

Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly
 100 105 110

Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp
 115 120 125

Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met
 130 135 140

Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala
 145 150

<210> 71

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: C-1

<400> 71

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

ES 2 708 657 T3

Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile
 20 25 30

Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
 35 40 45

Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
 50 55 60

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
 65 70 75 80

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 85 90 95

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
 100 105 110

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
 115 120 125

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
 130 135 140

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala
 145 150

<210> 72

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: C-2

<400> 72

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

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr
 20 25 30

Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
 35 40 45

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 50 55 60

ES 2 708 657 T3

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
65 70 75 80

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
85 90 95

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg
100 105 110

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp
115 120 125

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr
130 135 140

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
145 150

<210> 73

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 1-S

<400> 73

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

Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys
20 25 30

Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala
35 40 45

Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr
50 55 60

Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp
65 70 75 80

Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys
85 90 95

Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr
100 105 110

Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg

ES 2 708 657 T3

115

120

125

Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val
 130 135 140

Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly
 145 150

<210> 74

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 2-G

<400> 74

Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
 20 25 30

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 35 40 45

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
 50 55 60

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 65 70 75 80

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 85 90 95

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 100 105 110

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 115 120 125

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 130 135 140

Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser
 145 150

10 <210> 75

<211> 152

ES 2 708 657 T3

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 5-Q

5 <400> 75

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
1 5 10 15

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
20 25 30

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp
35 40 45

Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro
50 55 60

Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu
65 70 75 80

Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly
85 90 95

Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu
100 105 110

Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile
115 120 125

Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
130 135 140

Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
145 150

<210> 76

<211> 152

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 6-L

<400> 76

ES 2 708 657 T3

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe
 1 5 10 15

Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val
 20 25 30

Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met
 35 40 45

Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu
 50 55 60

Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu
 65 70 75 80

Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr
 85 90 95

Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys
 100 105 110

Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp
 115 120 125

Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala
 130 135 140

Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
 145 150

<210> 77

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 8-E

<400> 77

ES 2 708 657 T3

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

Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg
 20 25 30

Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn
 35 40 45

Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu
 50 55 60

Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile
 65 70 75 80

Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser
 85 90 95

Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr
 100 105 110

Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp
 115 120 125

Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr
 145 150

<210> 78

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 9-E

<400> 78

ES 2 708 657 T3

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

Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser
 20 25 30

Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu
 35 40 45

Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr
 50 55 60

Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg
 65 70 75 80

Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala
 85 90 95

Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp
 100 105 110

Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly
 115 120 125

Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu
 145 150

<210> 79

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 10-Q

<400> 79

ES 2 708 657 T3

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

Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu
 20 25 30

Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val
 35 40 45

Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met
 50 55 60

Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu
 65 70 75 80

Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala
 85 90 95

Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu
 100 105 110

Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln
 115 120 125

Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu
 145 150

<210> 80

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 11-I

<400> 80

ES 2 708 657 T3

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

Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly
 20 25 30

Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp
 35 40 45

Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met
 50 55 60

Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala
 65 70 75 80

Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu
 85 90 95

Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu
 100 105 110

Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val
 115 120 125

Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly
 130 135 140

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln
 145 150

<210> 81

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 13-E

<400> 81

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr
 1 5 10 15

Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
 20 25 30

ES 2 708 657 T3

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 35 40 45

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
 50 55 60

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
 65 70 75 80

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg
 85 90 95

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp
 100 105 110

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr
 115 120 125

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
 130 135 140

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala
 145 150

<210> 82

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 14-F

<400> 82

Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile
 1 5 10 15

Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
 20 25 30

Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
 35 40 45

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
 50 55 60

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 65 70 75 80

ES 2 708 657 T3

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
85 90 95

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
100 105 110

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
115 120 125

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
130 135 140

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu
145 150

<210> 83

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 16-E

<400> 83

Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr
1 5 10 15

Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu
20 25 30

Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly
35 40 45

Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys
50 55 60

Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp
65 70 75 80

Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met
85 90 95

Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile
100 105 110

Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe
115 120 125

Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr

ES 2 708 657 T3

130

135

140

Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys
145 150

<210> 84

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 26-D

<400> 84

Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu
1 5 10 15

Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val
20 25 30

Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met
35 40 45

Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu
50 55 60

Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala
65 70 75 80

Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu
85 90 95

Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln
100 105 110

Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
130 135 140

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly
145 150

10 <210> 85

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 708 657 T3

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 40-S

<400> 85

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

Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu
20 25 30

Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile
35 40 45

Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser
50 55 60

Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr
65 70 75 80

Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp
85 90 95

Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly
100 105 110

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

Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr
130 135 140

Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg
145 150

5 <210> 86

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> variante de calmodulina permutada: 45-P

<400> 86

ES 2 708 657 T3

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
 20 25 30

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
 35 40 45

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg
 50 55 60

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp
 65 70 75 80

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr
 85 90 95

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
 100 105 110

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
 115 120 125

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
 130 135 140

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
 145 150

<210> 87

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 46-T

<400> 87

ES 2 708 657 T3

Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
 1 5 10 15

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
 20 25 30

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 35 40 45

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
 50 55 60

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
 65 70 75 80

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
 85 90 95

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
 100 105 110

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe
 115 120 125

Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val
 130 135 140

Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
 145 150

<210> 88

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 56-E

<400> 88

ES 2 708 657 T3

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

<210> 89

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 59-A

<400> 89

ES 2 708 657 T3

Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met
 1 5 10 15

Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala
 20 25 30

Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu
 35 40 45

Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu
 50 55 60

Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val
 65 70 75 80

Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly
 85 90 95

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
 100 105 110

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
 115 120 125

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
 130 135 140

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp
 145 150

<210> 90

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 60-D

<400> 90

ES 2 708 657 T3

Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
 1 5 10 15

Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
 20 25 30

Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu
 35 40 45

Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
 50 55 60

Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn
 65 70 75 80

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala
 85 90 95

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
 100 105 110

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
 115 120 125

Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
 130 135 140

Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala
 145 150

<210> 91

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 61-G

<400> 91

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
 1 5 10 15

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
 20 25 30

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg
 35 40 45

ES 2 708 657 T3

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp
 50 55 60

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
 85 90 95

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
 100 105 110

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
 115 120 125

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp
 130 135 140

Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 145 150

<210> 92

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 62-N

<400> 92

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
 20 25 30

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
 35 40 45

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
 50 55 60

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
 65 70 75 80

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
 85 90 95

ES 2 708 657 T3

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe
 100 105 110

Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val
 115 120 125

Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met
 130 135 140

Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
 145 150

<210> 93

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 65-I

<400> 93

Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp
 1 5 10 15

Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys
 20 25 30

Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr
 35 40 45

Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg
 50 55 60

Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val
 65 70 75 80

Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu
 85 90 95

Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp
 100 105 110

Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser
 115 120 125

Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu
 130 135 140

Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr

ES 2 708 657 T3

145

150

<210> 94

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 75-A

<400> 94

```

Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala
1          5          10          15

Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu
          20          25          30

Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu
          35          40          45

Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val
          50          55          60

Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly
65          70          75          80

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
          85          90          95

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
          100          105          110

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
          115          120          125

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp
          130          135          140

Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met
145          150
    
```

10 <210> 95

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> variante de calmodulina permutada: 76-R

<400> 95

ES 2 708 657 T3

Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
1 5 10 15

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

Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
35 40 45

Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn
50 55 60

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala
65 70 75 80

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
85 90 95

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
100 105 110

Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
115 120 125

Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe
130 135 140

Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
145 150

<210> 96

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 77-K

<400> 96

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
1 5 10 15

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

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp
35 40 45

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr

ES 2 708 657 T3

50

55

60

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
65 70 75 80

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
85 90 95

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
100 105 110

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp
115 120 125

Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro
130 135 140

Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
145 150

<210> 97

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 79-K

<400> 97

Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
1 5 10 15

Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val
20 25 30

Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met
35 40 45

Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu
50 55 60

Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp
85 90 95

Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met
100 105 110

ES 2 708 657 T3

Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile
 115 120 125

Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe
 130 135 140

Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
 145 150

<210> 98

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 80-D

<400> 98

Asp Thr Asp Ser Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp
 1 5 10 15

Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met
 20 25 30

Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile
 35 40 45

Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe
 50 55 60

Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr
 65 70 75 80

Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys
 85 90 95

Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg
 100 105 110

Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn
 115 120 125

Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu
 130 135 140

Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys
 145 150

10 <210> 99

<211> 152

ES 2 708 657 T3

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 81-T

5 <400> 99

```

Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys
1          5          10          15

Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr
          20          25          30

Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg
          35          40          45

Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val
          50          55          60

Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu
65          70          75          80

Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp
          85          90          95

Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser
          100          105          110

Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu
          115          120          125

Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr
          130          135          140

Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp
145          150
    
```

<210> 100

<211> 152

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 82-D

<400> 100

```

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
1          5          10          15
    
```

ES 2 708 657 T3

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 20 25 30

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 35 40 45

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 50 55 60

Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu
 65 70 75 80

Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly
 85 90 95

Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu
 100 105 110

Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val
 115 120 125

Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met
 130 135 140

Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 145 150

<210> 101

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 85-E

<400> 101

Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly
 1 5 10 15

Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu
 20 25 30

Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile
 35 40 45

Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
 50 55 60

ES 2 708 657 T3

Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala
65 70 75 80

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

Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
100 105 110

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
115 120 125

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
130 135 140

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu
145 150

<210> 102

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 98-G

<400> 102

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
1 5 10 15

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
20 25 30

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
35 40 45

Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu
50 55 60

Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly
65 70 75 80

Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu
85 90 95

Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val
100 105 110

ES 2 708 657 T3

Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met
 115 120 125

Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu
 130 135 140

Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 145 150

<210> 103

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 99-N

<400> 103

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala
 20 25 30

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met
 35 40 45

Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln
 50 55 60

Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly
 85 90 95

Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp
 100 105 110

Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met
 115 120 125

Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala
 130 135 140

Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
 145 150

10 <210> 104

<211> 152

ES 2 708 657 T3

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 103-S

5 <400> 104

```

Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu
 1          5          10          15

Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly
 20          25          30

Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
 35          40          45

Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe
 50          55          60

Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr
 65          70          75          80

Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr
 85          90          95

Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn
100          105          110

Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
115          120          125

Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
130          135          140

Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile
145          150
    
```

<210> 105

<211> 152

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 104-A

<400> 105

```

Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr
 1          5          10          15
    
```

ES 2 708 657 T3

Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp
 20 25 30

Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly
 35 40 45

Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys
 50 55 60

Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr
 65 70 75 80

Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu
 85 90 95

Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly
 100 105 110

Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys
 115 120 125

Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp
 130 135 140

Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser
 145 150

<210> 106

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 110-V

<400> 106

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
 1 5 10 15

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu
 20 25 30

Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln
 35 40 45

Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe
 50 55 60

Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val

ES 2 708 657 T3

Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile
 130 135 140

Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val
 145 150

<210> 108

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 112-T

<400> 108

Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile
 1 5 10 15

Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe
 20 25 30

Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr
 35 40 45

Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys
 50 55 60

Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg
 65 70 75 80

Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn
 85 90 95

Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu
 100 105 110

Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile
 115 120 125

Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser
 130 135 140

Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met
 145 150

10 <210> 109

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 708 657 T3

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 113-N

<400> 109

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

5 <210> 110

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> variante de calmodulina permutada: 117-K

<400> 110

Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile
 1 5 10 15
 Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
 20 25 30

ES 2 708 657 T3

Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala
 35 40 45

Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr
 50 55 60

Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 85 90 95

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
 100 105 110

Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg
 115 120 125

Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg
 130 135 140

His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu
 145 150

<210> 111

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 118-L

<400> 111

Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala
 20 25 30

Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu
 35 40 45

Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile
 50 55 60

Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
 65 70 75 80

ES 2 708 657 T3

Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
85 90 95

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
100 105 110

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
115 120 125

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
130 135 140

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys
145 150

<210> 112

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 119-T

<400> 112

Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly
1 5 10 15

Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe
35 40 45

Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr
50 55 60

Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr
65 70 75 80

Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn
85 90 95

Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
100 105 110

Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
115 120 125

ES 2 708 657 T3

Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val
 130 135 140

Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu
 145 150

<210> 113

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 120-D

<400> 113

Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly
 20 25 30

Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys
 35 40 45

Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr
 50 55 60

Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly
 85 90 95

Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys
 100 105 110

Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp
 115 120 125

Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met
 130 135 140

Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr
 145 150

10 <210> 114

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 708 657 T3

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 123-V

<400> 114

Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val
1 5 10 15

Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly
20 25 30

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
35 40 45

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
50 55 60

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
65 70 75 80

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp
85 90 95

Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp
100 105 110

Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
115 120 125

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
130 135 140

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu
145 150

5 <210> 115

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> variante de calmodulina permutada: 124-D

<400> 115

Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn
1 5 10 15

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala
20 25 30

ES 2 708 657 T3

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
 35 40 45

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
 50 55 60

Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
 65 70 75 80

Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe
 85 90 95

Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser
 100 105 110

Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn
 115 120 125

Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly
 130 135 140

Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
 145 150

<210> 116

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 125-E

<400> 116

Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr
 1 5 10 15

Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
 20 25 30

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
 35 40 45

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
 50 55 60

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp
 65 70 75 80

Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro

ES 2 708 657 T3

Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
145 150

<210> 118

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 134-G

<400> 118

Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala
1 5 10 15

Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu
20 25 30

Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile
35 40 45

Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro
50 55 60

Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly
65 70 75 80

Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys
85 90 95

Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val
100 105 110

Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His
115 120 125

Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu
130 135 140

Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp
145 150

10 <210> 119

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> variante de calmodulina permutada: 135-D

ES 2 708 657 T3

<400> 119

Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe
 20 25 30

Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr
 35 40 45

Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr
 50 55 60

Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
 85 90 95

Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
 100 105 110

Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val
 115 120 125

Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met
 130 135 140

Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly
 145 150

<210> 120

<211> 152

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 144-V

<400> 120

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

Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys
 20 25 30

Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg
 35 40 45

10

ES 2 708 657 T3

Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn
50 55 60

Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu
65 70 75 80

Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile
85 90 95

Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser
100 105 110

Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr
115 120 125

Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp
130 135 140

Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe
145 150

<210> 121

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 148-T

<400> 121

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

Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly
20 25 30

Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln
35 40 45

Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala
50 55 60

Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala
65 70 75 80

Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe
85 90 95

ES 2 708 657 T3

Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu
 100 105 110

Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val
 115 120 125

Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn
 130 135 140

Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met
 145 150

<210> 122

<211> 152

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> variante de calmodulina permutada: 151-G

<400> 122

Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr
 20 25 30

Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr
 35 40 45

Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn
 50 55 60

Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
 65 70 75 80

Lys Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe
 85 90 95

Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val
 100 105 110

Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met
 115 120 125

Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu
 130 135 140

Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
 145 150

ES 2 708 657 T3

<210> 123

<211> 152

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> variante de calmodulina permutada: 152-G

<400> 123

```

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

Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr
          20           25           30

Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu
          35           40           45

Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly
          50           55           60

Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys
65           70           75           80

Asp Thr Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp
          85           90           95

Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met
          100          105          110

Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile
          115          120          125

Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe
          130          135          140

Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly
145           150
    
```

<210> 124

10 <211> 409

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD14 (TUEK4)_M-1

15 <400> 124

ES 2 708 657 T3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu
 115 120 125
 Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly
 130 135 140
 Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu
 145 150 155 160
 Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile
 165 170 175
 Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
 180 185 190
 Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala
 195 200 205
 Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr
 210 215 220
 Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn
 225 230 235 240
 Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp
 245 250 255

ES 2 708 657 T3

Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg
 260 265 270

Lys Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 275 280 285

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
 290 295 300

Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 305 310 315 320

Pro Arg Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
 325 330 335

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
 340 345 350

His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
 355 360 365

Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 370 375 380

Arg Thr Ala Ala Ala His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Arg Gly Ser His His His His His His
 405

<210> 125

<211> 409

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD14 (TUEK4)_M-2

<400> 125

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ES 2 708 657 T3

Gly Tyr Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu
 115 120 125

Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala
 130 135 140

Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu
 145 150 155 160

Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln
 165 170 175

Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser
 180 185 190

Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
 195 200 205

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
 210 215 220

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 225 230 235 240

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
 245 250 255

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 260 265 270

Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 275 280 285

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
 290 295 300

ES 2 708 657 T3

Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
305 310 315 320

Pro Arg Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
325 330 335

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
340 345 350

His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
355 360 365

Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
370 375 380

Arg Thr Ala Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Arg Gly Ser His His His His His His
405

<210> 126

<211> 409

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD14 (TUEK4)_C-1

<400> 126

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 708 657 T3

Ala Arg Glu Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp
115 120 125

Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu
130 135 140

Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr
145 150 155 160

Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp
165 170 175

Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro
180 185 190

Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser Glu
195 200 205

Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly
210 215 220

Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile
245 250 255

Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr
260 265 270

Ala Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
275 280 285

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
290 295 300

Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
305 310 315 320

Pro Arg Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
325 330 335

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
340 345 350

ES 2 708 657 T3

His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
 355 360 365

Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 370 375 380

Arg Thr Ala Ala Ala His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Arg Gly Ser His His His His His His
 405

<210> 127

<211> 409

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD14 (TUEK4)_C-2

<400> 127

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

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

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Asp Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala
 115 120 125

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
 130 135 140

ES 2 708 657 T3

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
 145 150 155 160
 Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
 165 170 175
 Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe
 180 185 190
 Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser
 195 200 205
 Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn
 210 215 220
 Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp
 245 250 255
 Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met
 260 265 270
 Thr Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 275 280 285
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn
 290 295 300
 Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Leu Ile Leu Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
 325 330 335
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
 340 345 350
 His Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
 355 360 365
 Lys Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 370 375 380
 Arg Thr Ala Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Arg Gly Ser His His His His His His

ES 2 708 657 T3

<210> 128

<211> 413

<212> PRT

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> scFv anti-biotina (18E7.2)_M-1

<400> 128

```

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Asn Trp Val
 35           40           45

Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Leu Tyr
 65           70           75           80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85           90           95

Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu Leu Gly Tyr Trp
 100          105          110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Met Lys Asp Thr
 115          120          125

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 130          135          140

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 145          150          155          160

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 165          170          175

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 180          185          190

```

ES 2 708 657 T3

Met Met Thr Ala Lys Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu
 195 200 205

Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly
 210 215 220

Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val
 245 250 255

Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met
 260 265 270

Met Ala Arg Lys Asp Ile Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
 275 280 285

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 290 295 300

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu
 305 310 315 320

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 325 330 335

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 340 345 350

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 355 360 365

Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 370 375 380

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala His His His His His Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser His His His His His His
 405 410

<210> 129

<211> 413

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-biotina (18E7.2)_M-2

ES 2 708 657 T3

<400> 129

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Asn Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu Leu Gly Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Ser Glu Glu Glu
 115 120 125
 Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile
 130 135 140
 Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu
 145 150 155 160
 Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly
 165 170 175
 Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys
 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe
 195 200 205
 Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr
 210 215 220
 Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr
 225 230 235 240

ES 2 708 657 T3

Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn
 245 250 255

Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met
 260 265 270

Lys Asp Thr Asp Asp Ile Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
 275 280 285

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 290 295 300

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu
 305 310 315 320

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 325 330 335

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 340 345 350

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 355 360 365

Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 370 375 380

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala His His His His His Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser His His His His His His
 405 410

<210> 130

<211> 413

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-biotina (18E7.2)_C-1

<400> 130

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

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

ES 2 708 657 T3

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Asn Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Gln Arg Val Gly Asp Tyr Val Ser Ser Leu Leu Gly Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Lys Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala
 130 135 140

Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu
 145 150 155 160

Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu
 165 170 175

Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile
 180 185 190

Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr
 195 200 205

Asp Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp
 210 215 220

Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn
 225 230 235 240

Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu
 245 250 255

Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln
 260 265 270

Met Met Thr Ala Asp Ile Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser
 275 280 285

ES 2 708 657 T3

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 290 295 300

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu
 305 310 315 320

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn
 325 330 335

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 340 345 350

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 355 360 365

Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 370 375 380

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Ala Ala His His His His His Ser
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser His His His His His His
 405 410

<210> 131

<211> 406

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD4 (Q425)_M-1

<400> 131

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ES 2 708 657 T3

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

ES 2 708 657 T3

Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu
 340 345 350

Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 355 360 365

Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 370 375 380

Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser
 385 390 395 400

His His His His His His
 405

<210> 132

<211> 406

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD4 (Q425)_M-2

<400> 132

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Glu Asp Gly Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Ser Glu Glu Glu Ile Arg
 115 120 125

ES 2 708 657 T3

Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn Gly Tyr Ile Ser Ala
 130 135 140

Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp
 145 150 155 160

Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Ile Asp Gly Asp Gly
 165 170 175

Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met Thr Ala Lys Gly Gly
 180 185 190

Ser Gly Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu
 195 200 205

Ala Phe Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys
 210 215 220

Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala
 225 230 235 240

Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr
 245 250 255

Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp
 260 265 270

Thr Asp Asp Ile Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 275 280 285

Val Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp
 290 295 300

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro
 305 310 315 320

Lys Phe Phe Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
 325 330 335

Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu
 340 345 350

Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 355 360 365

Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 370 375 380

ES 2 708 657 T3

Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser
385 390 395 400

His His His His His His
405

<210> 133

<211> 406

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD4 (Q425)_C-1

<400> 133

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Asp Gly Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Lys Gly Gly Ser Gly Ala
115 120 125

Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser
130 135 140

Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly
145 150 155 160

Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln
165 170 175

ES 2 708 657 T3

Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp Phe
 180 185 190
 Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp Ser
 195 200 205
 Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly Asn
 210 215 220
 Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp
 245 250 255
 Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met Met
 260 265 270
 Thr Ala Asp Ile Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 275 280 285
 Val Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp
 290 295 300
 Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro
 305 310 315 320
 Lys Phe Phe Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
 325 330 335
 Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu
 340 345 350
 Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
 355 360 365
 Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 370 375 380
 Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser
 385 390 395 400
 His His His His His His
 405

<210> 134

<211> 406

<212> PRT

ES 2 708 657 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> scFv anti-CD4 (Q425)_C-2

<400> 134

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Glu Asp Gly Asn Trp Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Lys Gly Gly Ser Gly
 115 120 125

Ala Asp Gln Leu Thr Glu Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe
 130 135 140

Ser Leu Phe Asp Lys Asp Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu
 145 150 155 160

Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu
 165 170 175

Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly Asn Gly Thr Ile Asp
 180 185 190

Phe Pro Glu Phe Leu Thr Met Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr Asp
 195 200 205

Ser Glu Glu Glu Ile Arg Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gly
 210 215 220

ES 2 708 657 T3

Asn Gly Tyr Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu
225 230 235 240

Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala
245 250 255

Asp Ile Asp Gly Asp Gly Gln Val Asn Tyr Glu Glu Phe Val Gln Met
260 265 270

Met Thr Asp Ile Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
275 280 285

Val Ala Ile Gly Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp
290 295 300

Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro
305 310 315 320

Lys Phe Phe Ile Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser
325 330 335

Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu
340 345 350

Asn Met Leu Ser Glu Asp Val Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp
355 360 365

Thr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
370 375 380

Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly Arg Gly Ser
385 390 395 400

His His His His His His
405

<210> 135

<211> 263

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> clon D1.3 (TS); scFv derivado de anticuerpo murino contra lisozima de clara de huevo de gallina

<400> 135

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

ES 2 708 657 T3

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30

Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu His Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ala Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 130 135 140

Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly
 145 150 155 160

Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser
 165 170 175

Pro Gln Leu Leu Val Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro
 180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile
 195 200 205

Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe
 210 215 220

Trp Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Ala Ala Ala His His His His His His Ser Ser Gly Gly Gly Arg Gly
 245 250 255

Ser His His His His His His
 260

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende
 - i) un polipéptido que comprende calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están unidos a través de dicha calmodulina,
- 5 ii) una molécula de unión a la calmodulina;
- iii) los iones que se unen al sitio de unión de Ca²⁺ de la calmodulina,
- en la que la unión de dicha molécula de unión a la calmodulina y de dichos iones a dicho sitio de unión de Ca²⁺ de la calmodulina afecta la unión de dicho polipéptido a un antígeno para estar unidos por dicho polipéptido.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha unión de dicha molécula de unión a calmodulina y de iones a dicho sitio de unión de Ca²⁺ de calmodulina aumenta o reduce la afinidad de dicho polipéptido a dicho antígeno.
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha molécula de unión a calmodulina es un péptido de unión a calmodulina.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha calmodulina es una calmodulina permutada.
- 15 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha calmodulina permutada tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 67 a SEQ ID NO: 123.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que dicho péptido de unión a calmodulina tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 65.
- 20 7. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha calmodulina permutada tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 67 y SEQ ID NO: 68 y dicho péptido de unión a la calmodulina tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 46, o en la que dicha calmodulina permutada tiene la secuencia SEQ ID NO: 68 y dicho péptido de unión a calmodulina tiene la secuencia SEQ ID NO: 53, o en la que dicha calmodulina permutada tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 y dicho péptido de unión a la calmodulina tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51 y SEQ ID NO: 53.
- 25 8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho polipéptido es un Fv de cadena sencilla (scFv) que comprende la calmodulina y una región variable de una cadena pesada de una inmunoglobulina y una región variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina.
- 30 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicho polipéptido es parte de un dominio de unión a antígeno de un receptor de antígeno quimérico (CAR), comprendiendo dicho CAR un dominio de unión a antígeno, un dominio transmembrana y un dominio de señalización citoplasmática.
- 35 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho polipéptido que comprende dicha calmodulina permutada y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en la que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulina están unidos a través de dicha calmodulina permutada, puede obtenerse mediante el método que comprende las etapas
 - a) Creación de al menos una secuencia de ácido nucleico de inserción que codifica una calmodulina permutada
 - 40 b) Creación de una secuencia de ácido nucleico aceptor que codifica un polipéptido que comprende dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas
 - c) Insertar al menos una secuencia de inserción de a) en la secuencia aceptora de b), en la que se inserta una secuencia de inserción de a) entre las partes de la secuencia aceptora b) que codifican los dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas de b)
 - 45 d) Transformar un huésped con las secuencias de ácido nucleico de c)
 - e) Selección de los huéspedes transformados que albergan la secuencia o secuencias de c)
 - f) Detección de los huéspedes transformados que expresan polipéptidos que comprenden dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas unidos a través de calmodulina permutada exponiendo los polipéptidos producidos por los huéspedes transformados a dicha molécula de unión a calmodulina e identificando los huéspedes

transformados que albergan polipéptidos que impactan la unión de dichos polipéptidos al antígeno en la presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina.

5 11. Un método *in vitro* para afectar la unión de un polipéptido por un antígeno que se une, en el que dicho polipéptido comprende una calmodulina y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están enlazados a través de dicha calmodulina, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto dicho polipéptido con una molécula de unión a calmodulina en presencia de iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina, afectando así la unión de dicho polipéptido al antígeno.

10 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido se pone en contacto con el antígeno que se une mediante dicho polipéptido antes de dicho contacto de dicha molécula de unión a calmodulina con dicho polipéptido.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicha afectación de la unión es una reducción de la unión, liberando así el polipéptido del antígeno.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha calmodulina es una calmodulina permutada.

15 15. El uso *in vitro* de un polipéptido que comprende una calmodulina permutada y dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas, en el que dichos dos dominios de la superfamilia de inmunoglobulinas están enlazados a través de dicha calmodulina permutada para afectar en presencia de una molécula de unión a calmodulina y iones que se unen al sitio de unión de Ca^{2+} de la calmodulina, la unión de dicho polipéptido a un antígeno que se unirá mediante dicho polipéptido.

20

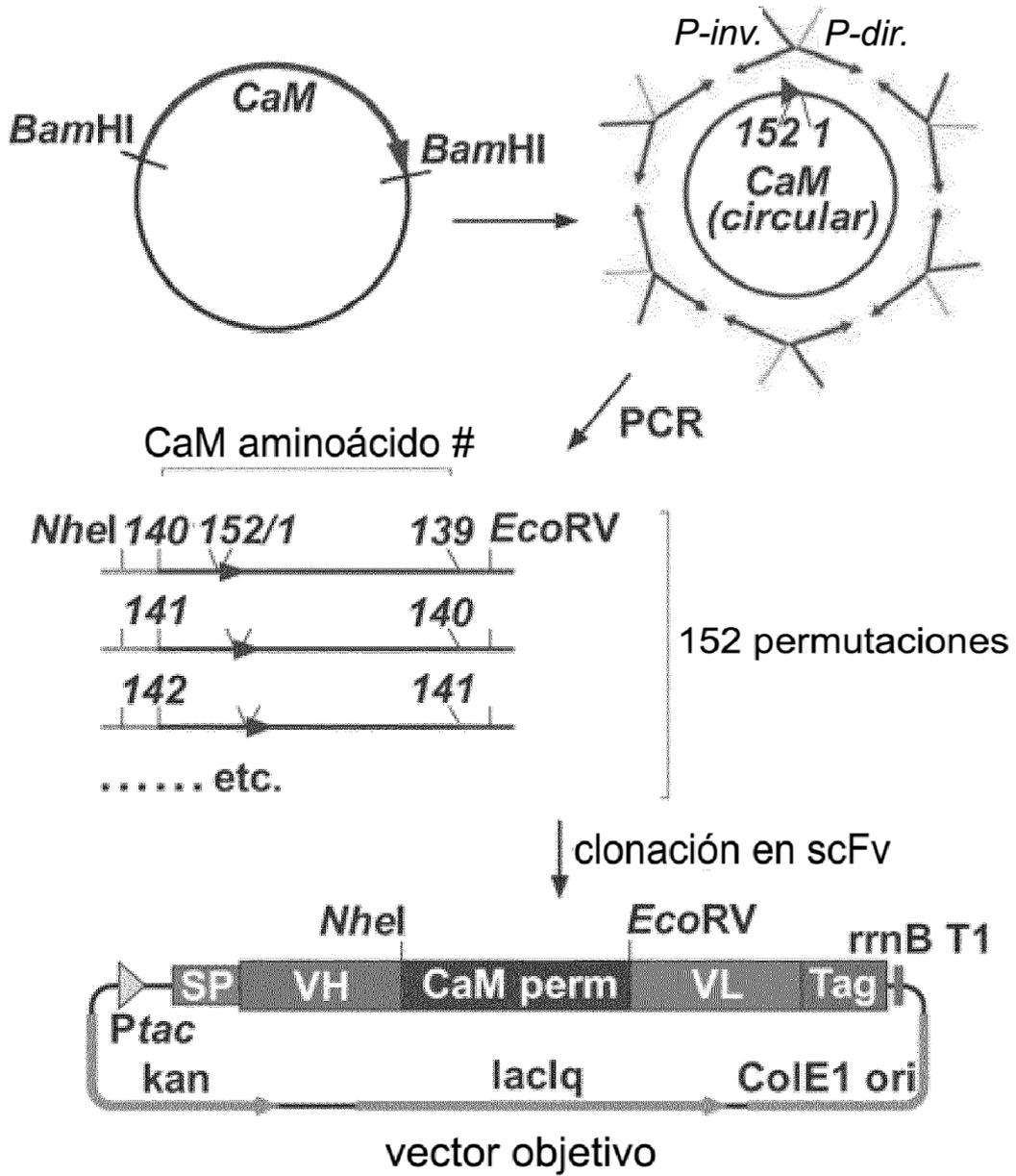


FIG 1

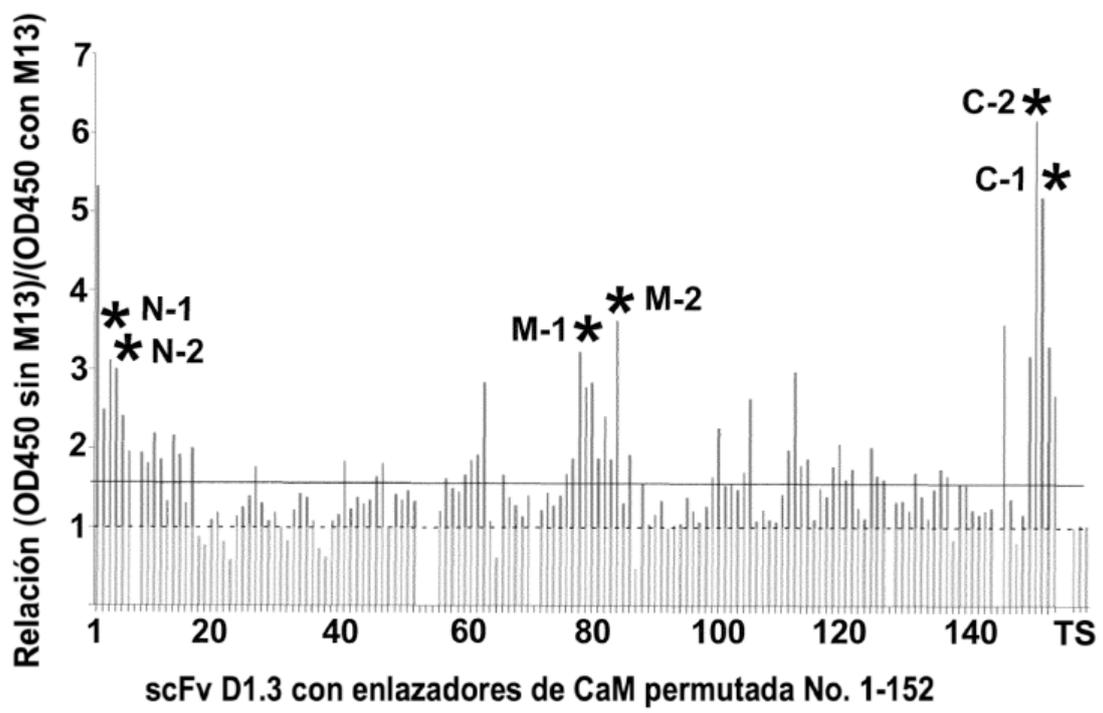


FIG 2

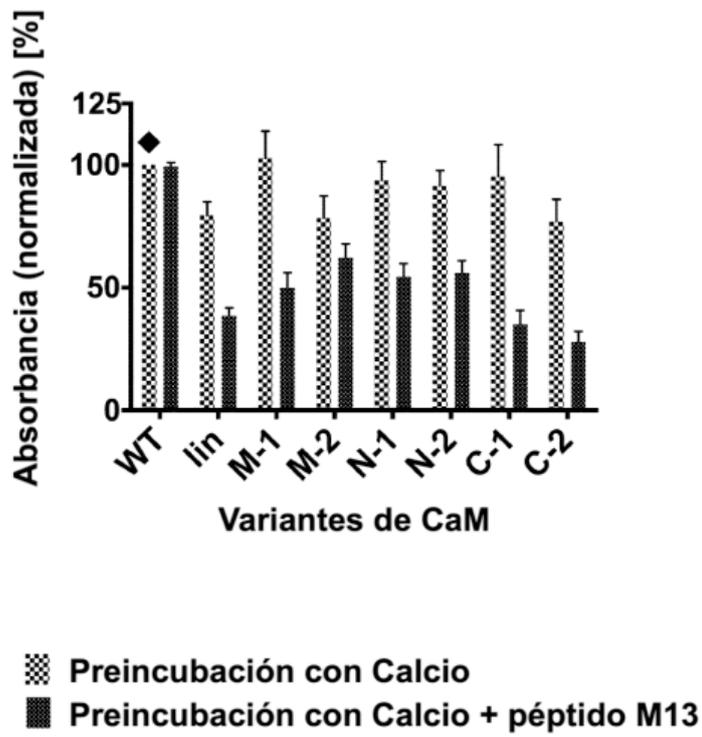
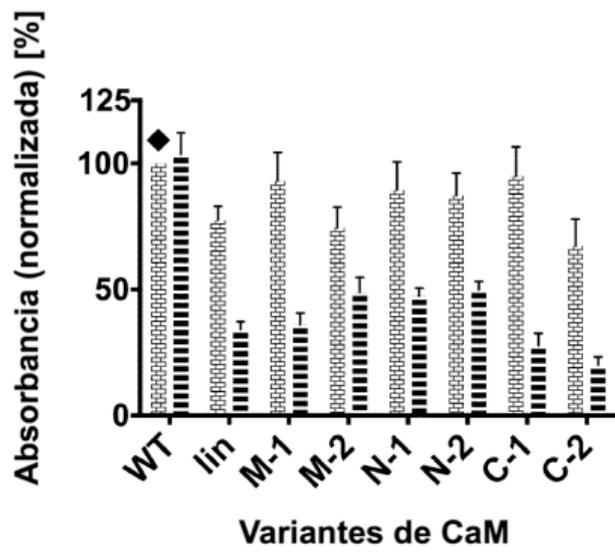


FIG 3A



 Liberación con Calcio
 Liberación con Calcio + péptido M13

FIG 3B

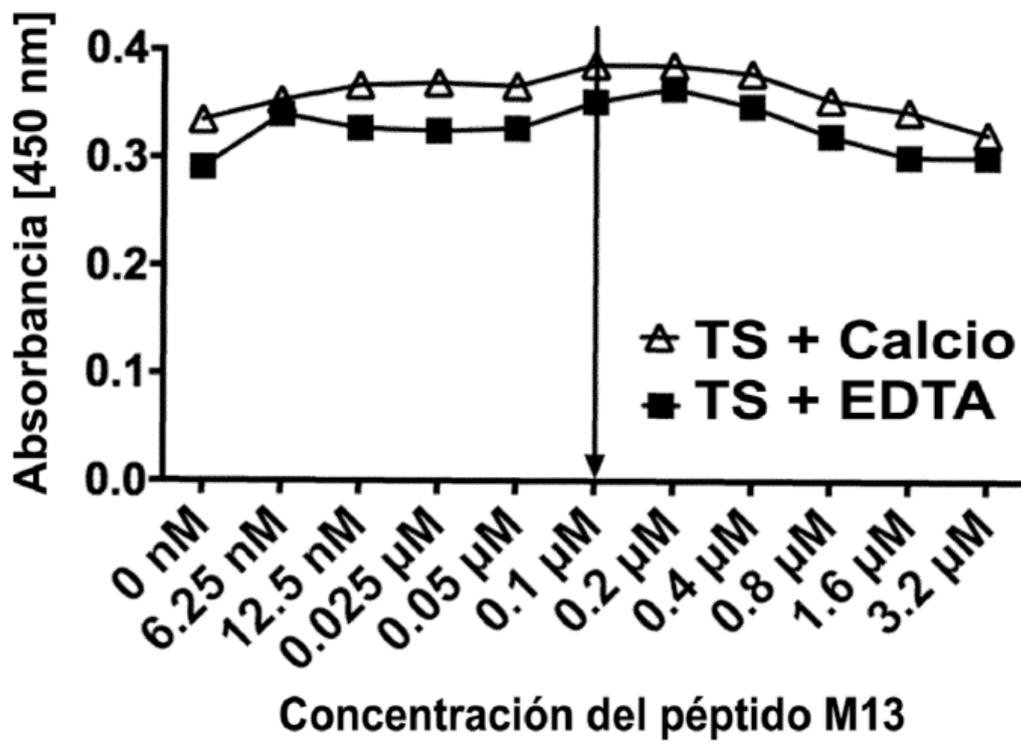


FIG 4A

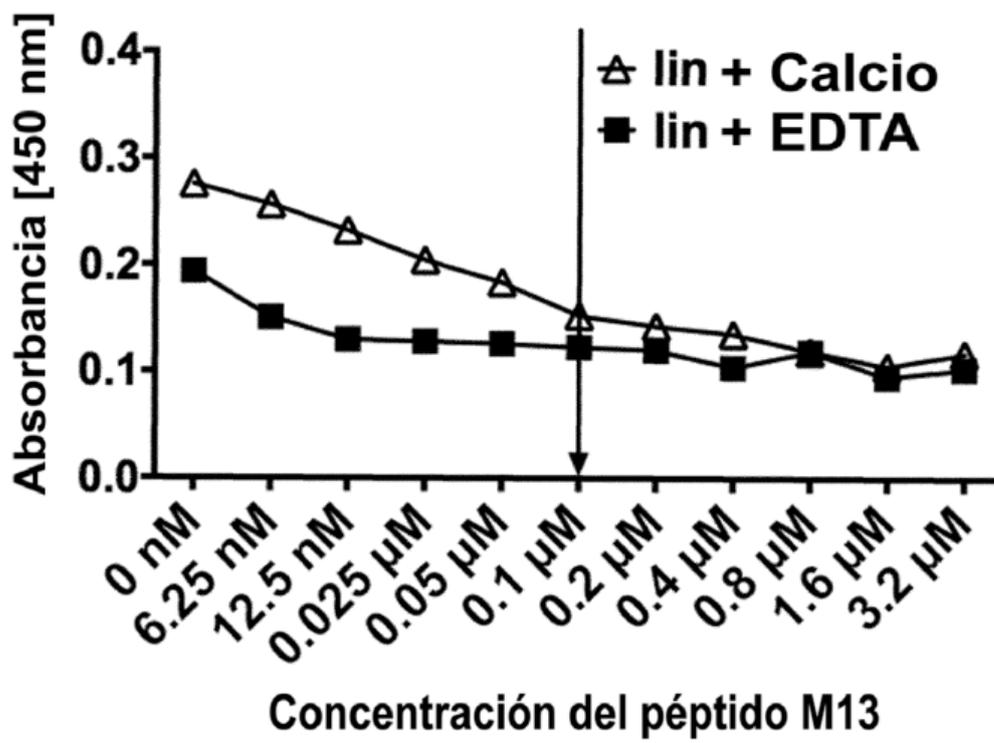


FIG 4B

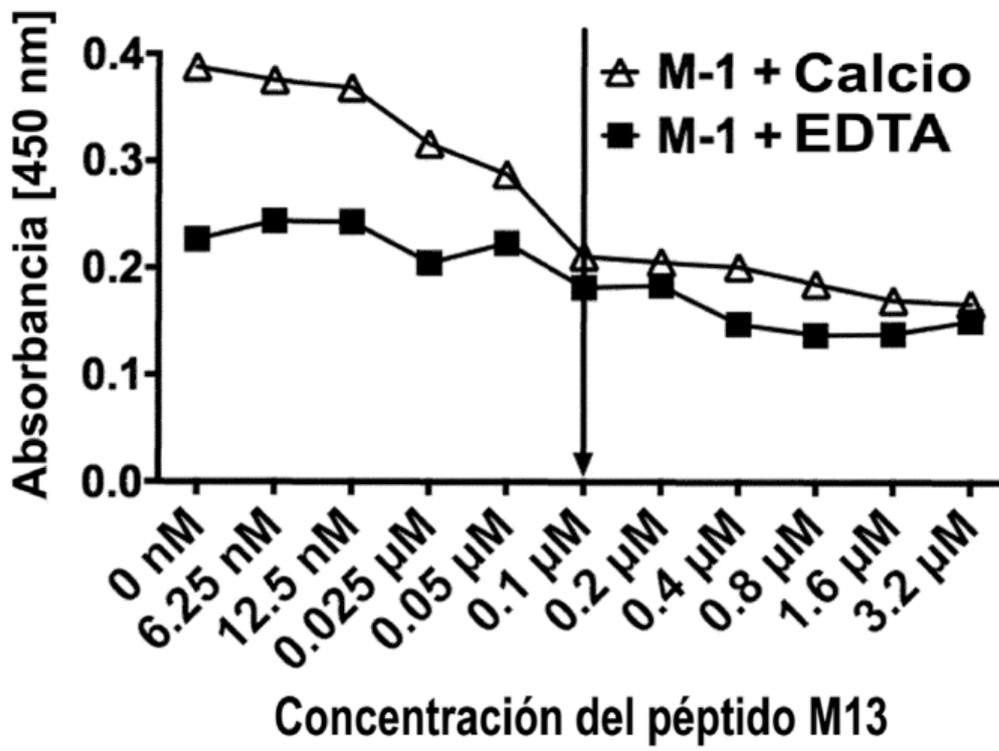


FIG 4C

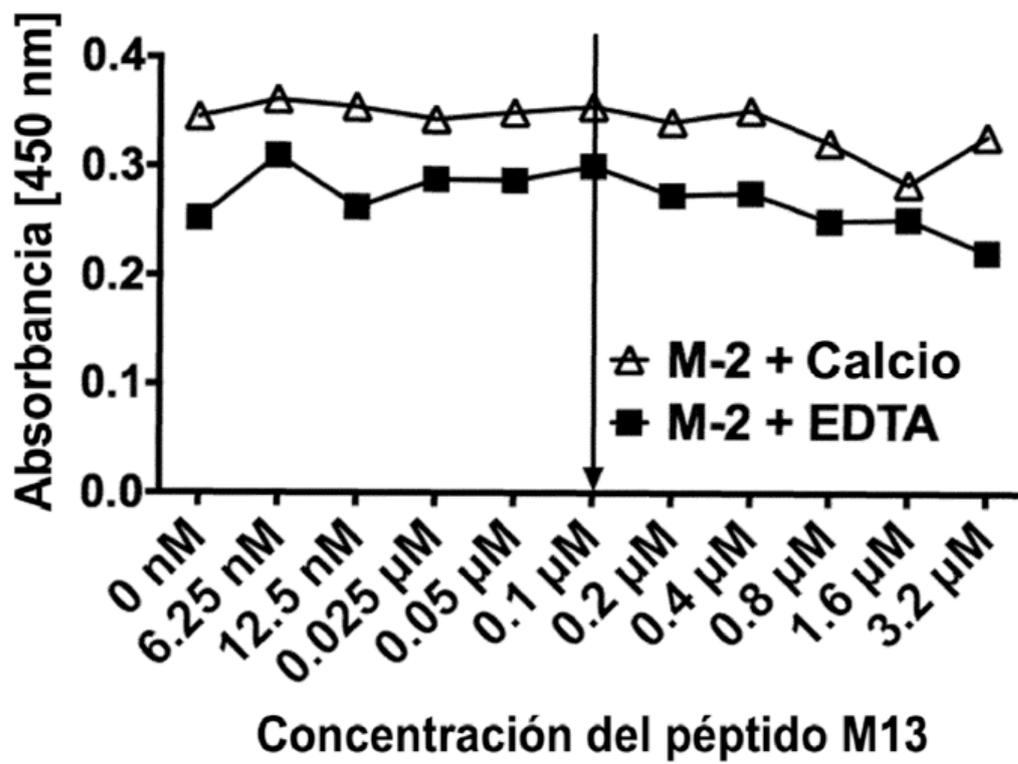


FIG 4D

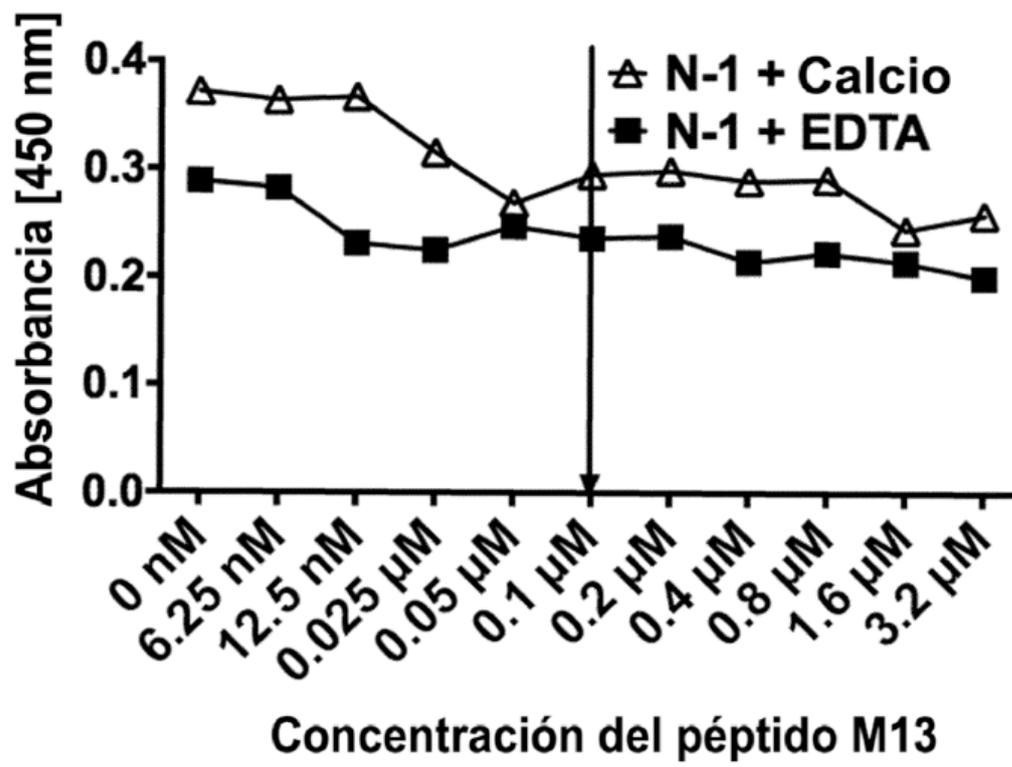


FIG 4E

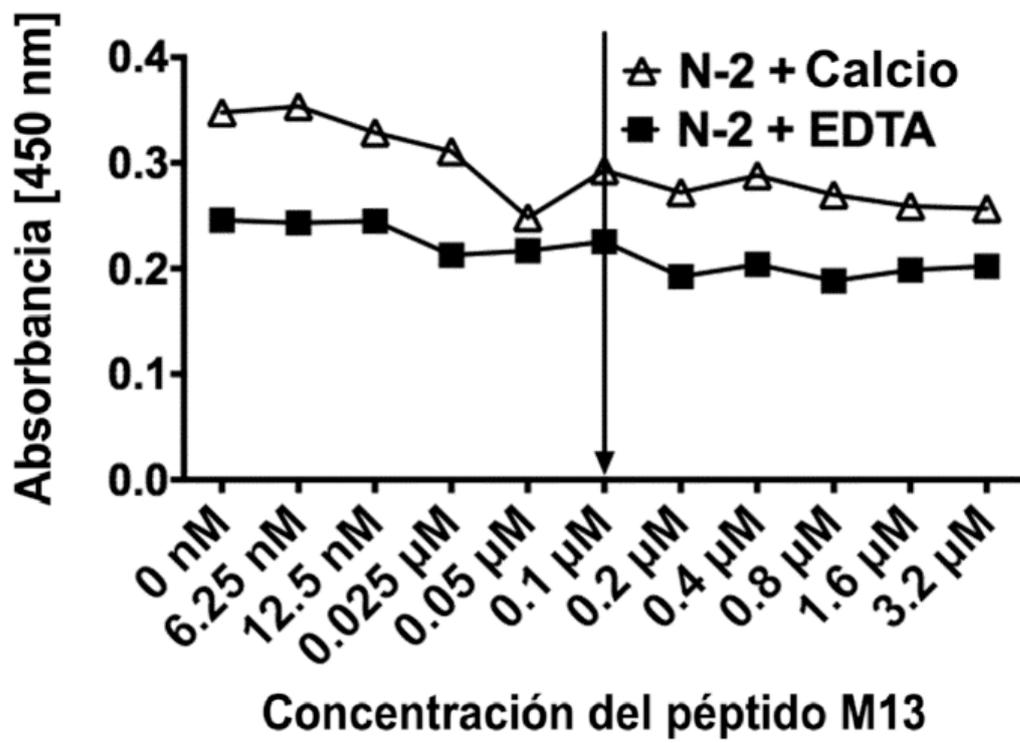


FIG 4F

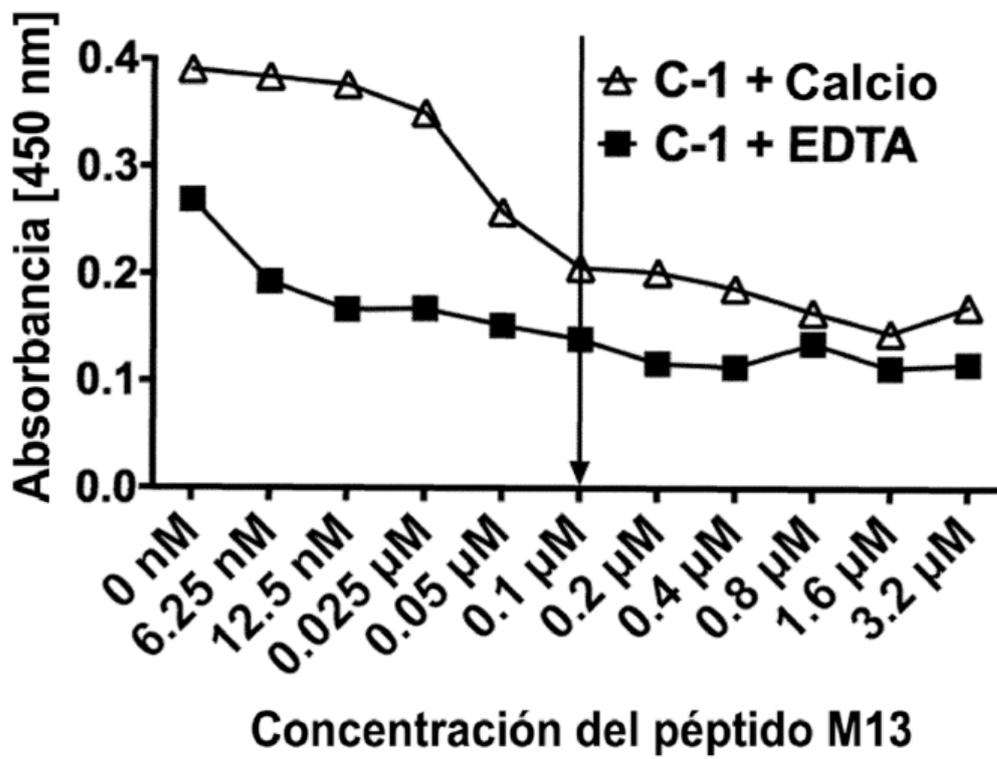


FIG 4G

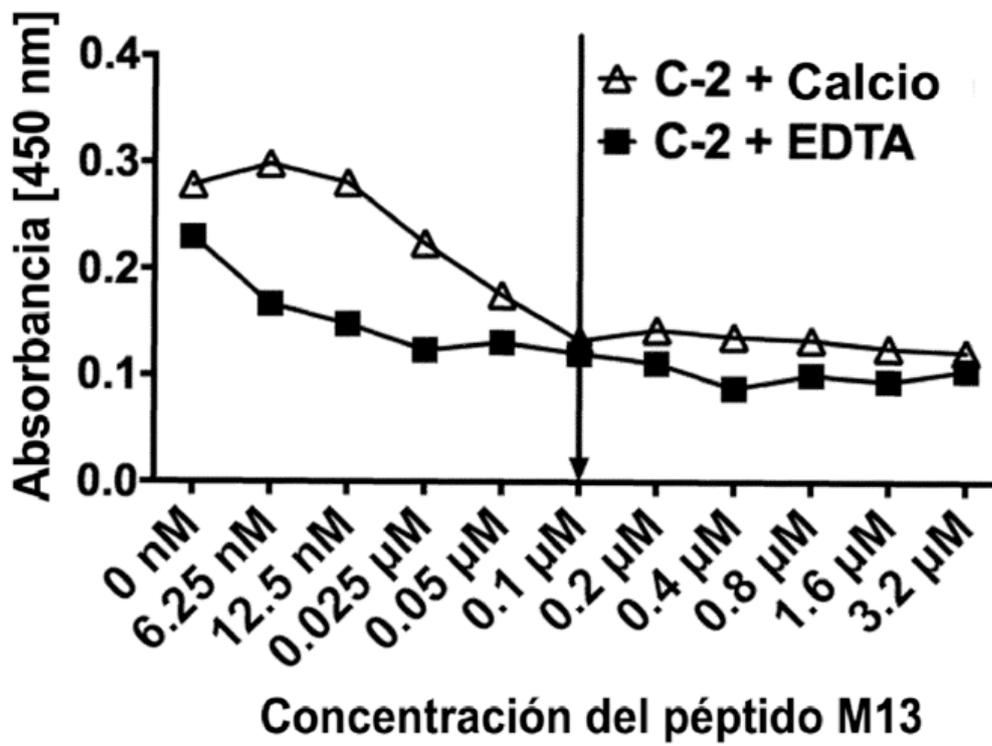


FIG 4H

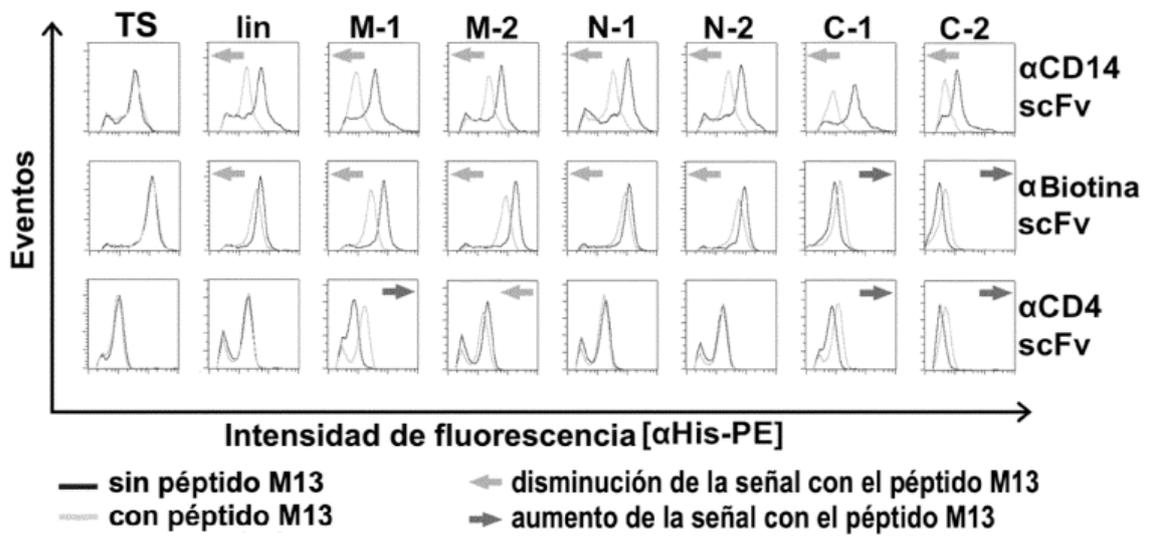


FIG 5A

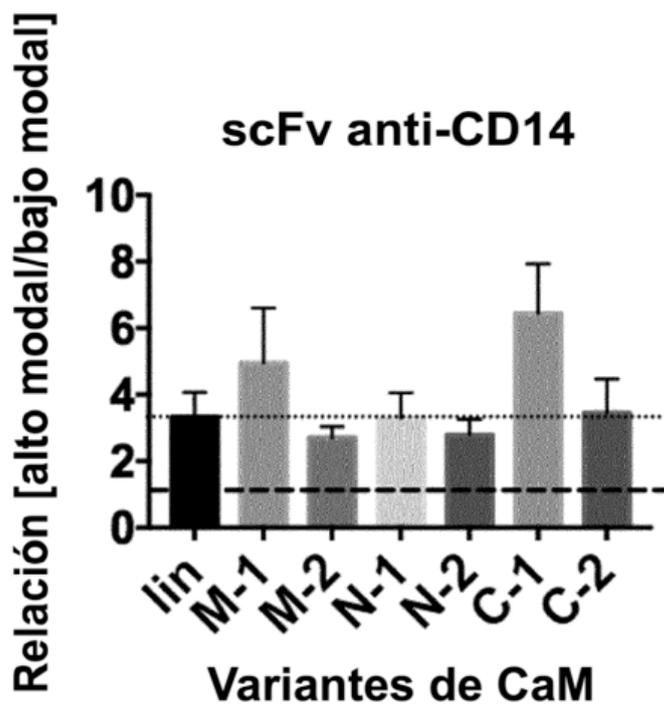


FIG 5B

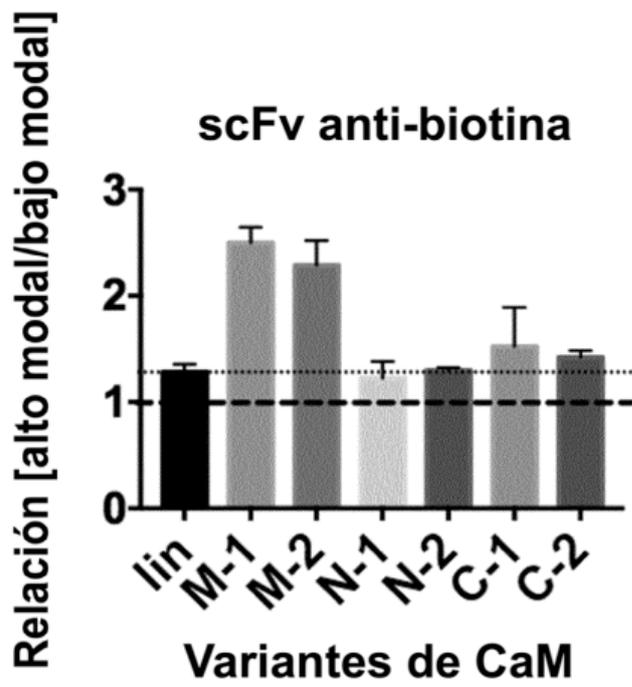


FIG 5C

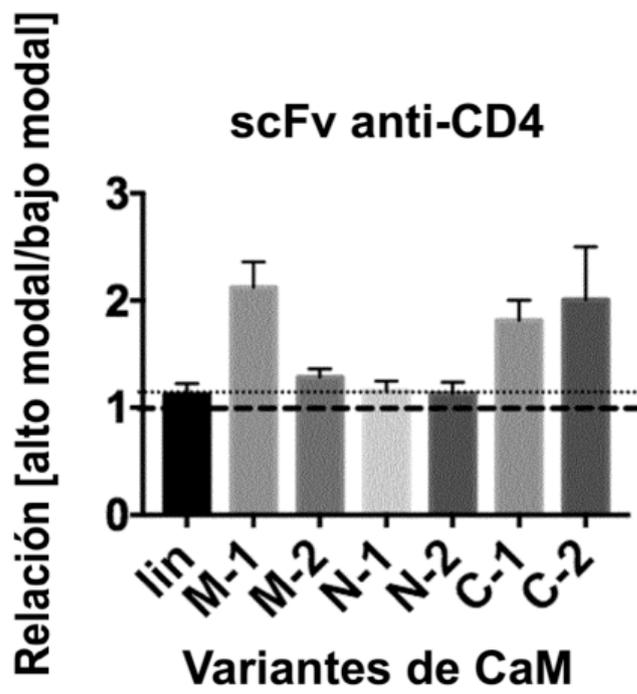


FIG 5D

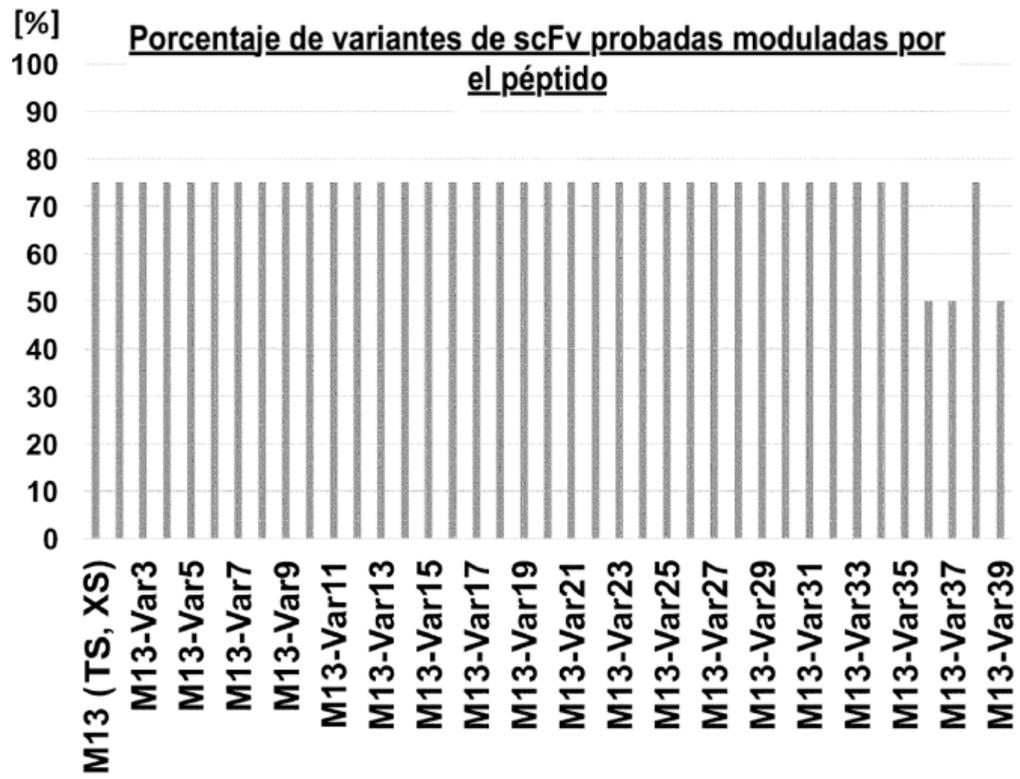


FIG 6A

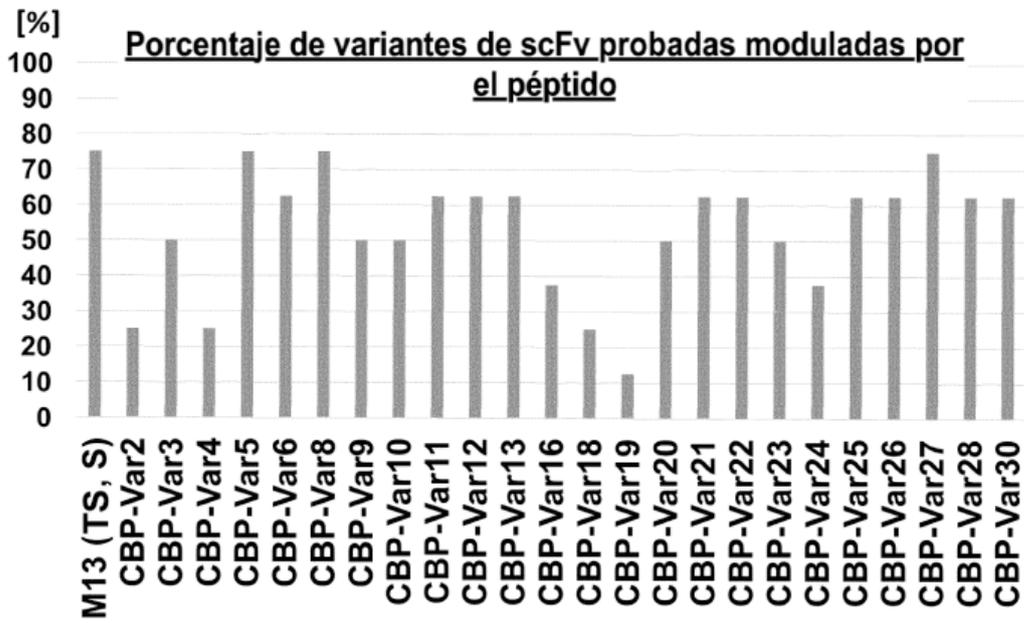


FIG 6B

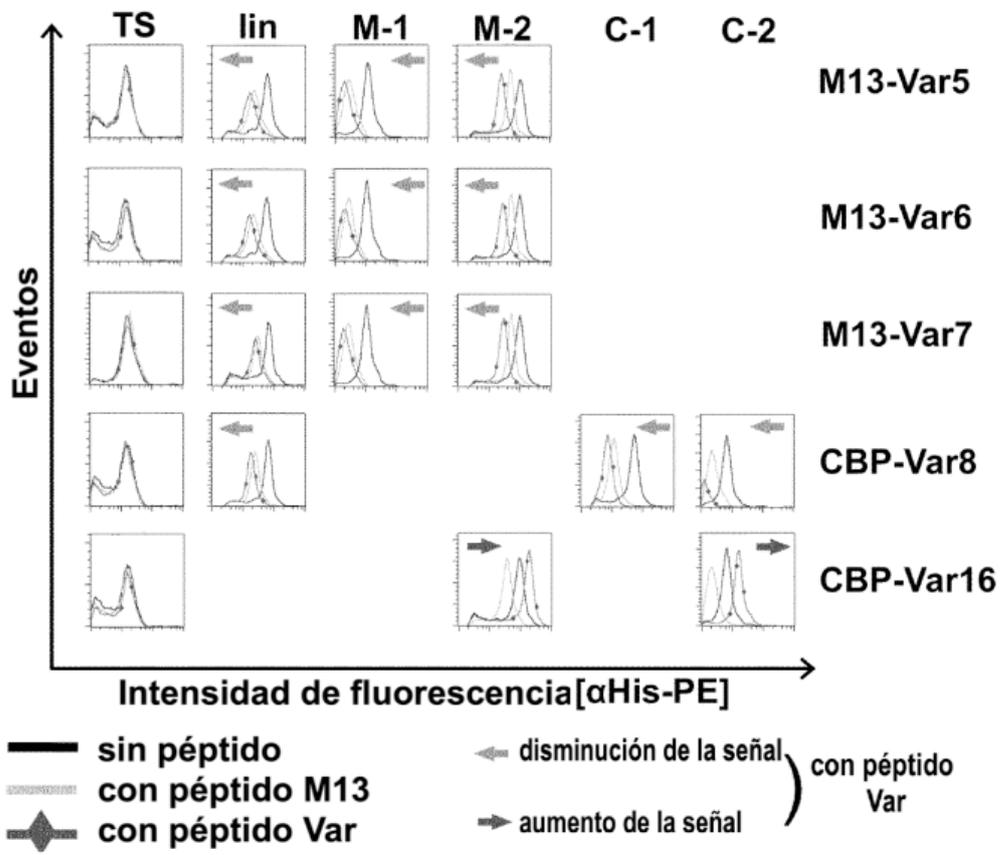


FIG 7A

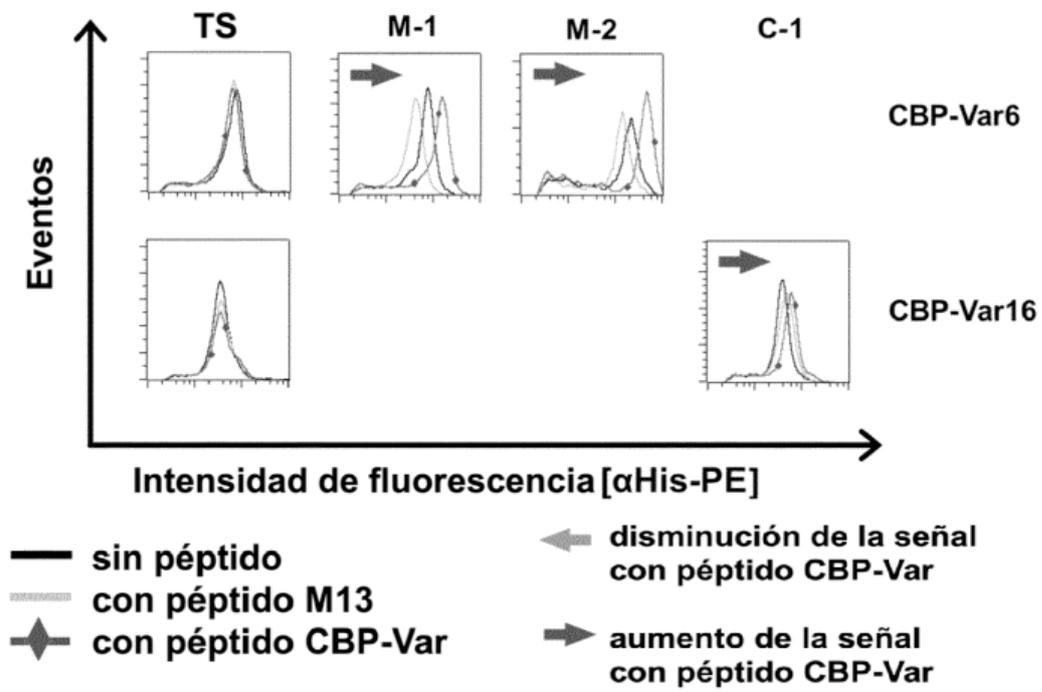


FIG 7B

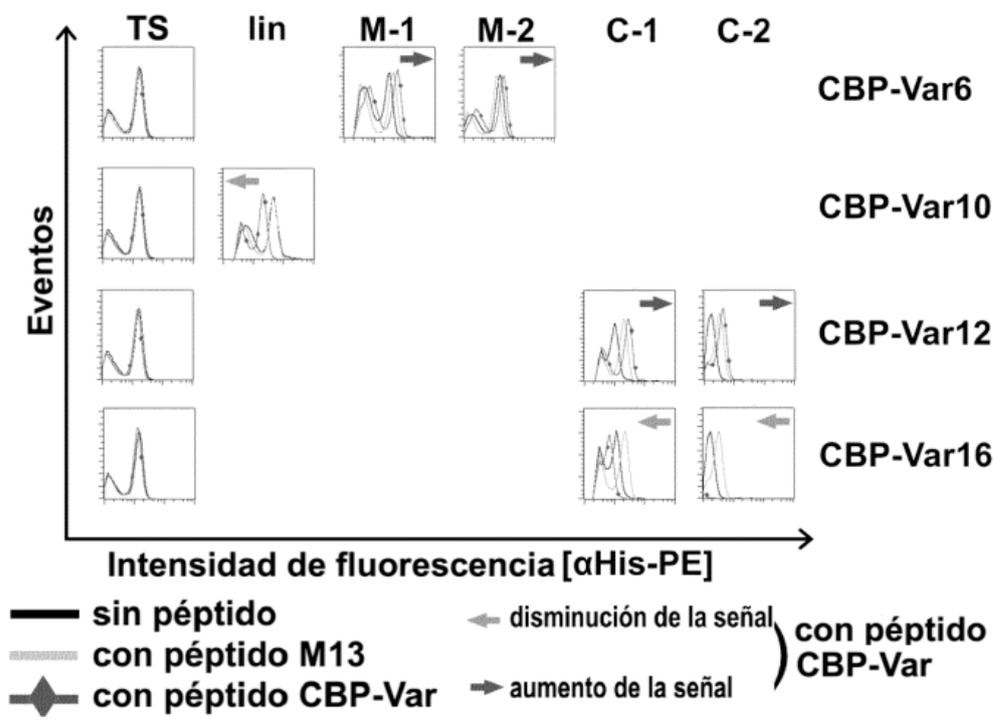


FIG 7C