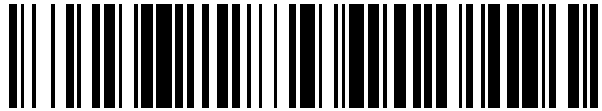


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 981**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2011 PCT/EP2011/074241**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2011 E 11802963 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2658869**

54 Título: **Formatos de unión a antígeno para uso en tratamientos terapéuticos o ensayos diagnósticos**

30 Prioridad:

30.12.2010 EP 10306541
30.12.2010 US 201061428294 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2019

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE MARSEILLE (33.3%)

72 Inventor/es:

BATY, DANIEL;
CHAMES, PATRICK;
MANSAIS, MARTINE;
KERFELEC, BRIGITTE y
ROZAN, CAROLINE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 735 981 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

Formatos de unión a antígeno para uso en tratamientos terapéuticos o ensayos diagnósticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a formatos de unión con el antígeno para su uso en tratamientos terapéuticos o ensayos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos han conseguido algunos éxitos clínicos en los últimos años, particularmente en oncología. Hay en el mercado más de veinticinco mAbs.

10 Se han hecho muchos esfuerzos técnicos para generar mAbs de segunda generación con inmunogenicidad disminuida y con funciones efectoras optimizadas. Dado que la mayoría de los anticuerpos terapéuticos son IgG1, al menos parte de los efectos de los mAbs observados *in vivo* podrían inducirse después de interacciones entre su región Fc y FcγR. Especialmente, la capacidad de los mAbs para destruir células tumorales se ha relacionado con su capacidad para reclutar y activar células efectoras tales como las células NK y macrófagos a través de receptores para la porción Fc de IgG (FcγR).

15 Sin embargo, publicaciones recientes han demostrado que la eficacia de los mAbs terapéuticos humanos IgG1 se ve fuertemente afectada por varios parámetros: cambios en la glicosilación de Fc, polimorfismo de FcγRIIIA, interacción con FcγRIIB inhibitorio y competencia con IgG endógena por la unión de FcγRI y FcγRIII. Por ejemplo, los estudios con ratones FcγR^{-/-} han revelado la implicación de diferentes FcγR en algunos mecanismos de acción *in vivo* de dos mAbs terapéuticos ampliamente utilizados, trastuzumab y rituximab. Estos mAbs citotóxicos dirigidos contra los tumores involucran tanto a los receptores activadores (FcγRIIIA) como a los inhibidores (FcγRIIB). En estos estudios se observó una regresión tumoral más pronunciada en ratones deficientes en FcγRIIB que en ratones de tipo silvestre, mientras que los ratones deficientes en FcγRIIIA no pudieron detener el crecimiento del tumor en presencia de mAbs terapéuticos. En seres humanos, un estudio reciente ha demostrado que la eficacia terapéutica del rituximab (una IgG1 humana quimérica) en pacientes con linfoma no Hodgkin se correlaciona en parte con el polimorfismo de FcγRIIIA. Por lo tanto, pacientes homocigotos para el alelo Val158 (aglutinante alto de IgG1) mostraron una mayor respuesta al tratamiento que los pacientes homocigotos para el alelo Phe158 (aglutinante bajo de IgG1). De manera similar, se ha demostrado que las glicofomas de IgG diseñadas activan la ADCC optimizada a través del reclutamiento de FcγRIIIAA. Un primer estudio indicó que un anticuerpo IgG1 diseñado para contener cantidades crecientes de oligosacáridos complejos bisectados (bisección de N-acetilglucosamina, GlcNAC) permite el desencadenamiento de una ADCC fuerte en comparación con su contraparte parental. En segundo lugar, se ha demostrado que la falta de fucosa o el bajo contenido de fucosa en los oligosacáridos ligados a N de IgG1 humanos mejora la unión de FcγRIIIA y ADCC, así como aumenta la tasa de *clearance* o aclaramiento de los glóbulos rojos Rhesus D⁺ en voluntarios humanos. Además, recientemente se ha demostrado que la densidad antigénica requerida para inducir una ADCC eficiente es menor cuando la IgG tiene un bajo contenido en fucosa en comparación con una IgG altamente fucosilada.

35 La idea de la necesidad de un mejor control de las interacciones Fc/Fcγ cuando se usaban mAbs terapéuticos se discutió claramente a principios de los 80 y condujo al concepto y la generación de anticuerpos biespecíficos (bsAbs), utilizando planteamientos bioquímicos y luego ingeniería molecular al principio de los años 90. Los anticuerpos biespecíficos capaces de reunir a las células diana y las células efectoras activadas tienen importantes ventajas potenciales sobre los mAbs desnudos completos. Especialmente, con respecto al reclutamiento y activación de las células NK, los bsAbs hacen posible superar la mayoría de los problemas encontrados con los mAbs terapéuticos. En primer lugar, es mucho más fácil usar una unión con el brazo del anticuerpo a FcγRIIIA que diseñar y afinar la interacción entre la región Fc del anticuerpo y FcγRIIIA. De hecho, es posible seleccionar un aglutinante FcγRIIIA carente de reacción cruzada para FcγRIIB inhibitorio y dirigirse a un epítipo no implicado en la unión de Fc para evitar el problema del polimorfismo de aglutinante FcγRIIIA alto/bajo, así como la competencia de IgG endógena. Además, los fragmentos de anticuerpos no están afectados por los problemas de glicosilación, y es posible ajustar la afinidad del anticuerpo desde un margen de μM a uno de nM, es decir, una afinidad hasta 1.000 veces mayor que la involucrada en la interacción Fc/FcγRIIIA. Así pues, se han realizado varios intentos para crear bsAbs anti-FcγRIIIA x anti-diana.

45 Sin embargo, durante años, estos intentos se vieron impedidos por la imposibilidad de producir de manera eficiente tales moléculas, requiriendo las técnicas más eficaces gramos de mAbs para producir miligramos de preparaciones heterogéneas de bsAbs. Por tanto, la primera generación de bsAbs nunca llegó al mercado, debido sobre todo al coste de la obtención de moléculas con propiedades bifuncionales en grandes cantidades para un uso terapéutico.

55 Los autores de la presente invención han desarrollado recientemente una nueva generación de anticuerpos biespecíficos, basados en VHH de llama (sdAb para anticuerpos de dominio único o también Nb para nanocuerpo (*nanobody*), que pueden producirse fácilmente en *E. coli* y que superan las limitaciones enumeradas anteriormente, mientras se es capaz de ejercer una fuerte lisis tumoral en concentraciones extremadamente bajas. Estos anticuerpos biespecíficos se describen en la solicitud de patente internacional n° WO/2006/064136. Esta generación de anticuerpos terapéuticos tiene el potencial de traducirse rápidamente en terapias eficientes. Aunque estos bsAbs se acumulan dentro del tumor, sufren una rápida eliminación debido a su tamaño relativamente pequeño, por debajo del

umbral renal (alrededor de 60 kDa) y a la ausencia de la región Fc involucrada en la interacción con el receptor FcRn, responsable de la larga vida mitad en suero de la IgG de longitud completa. La solicitud de patente WO2010/035012 describe varios anticuerpos, incluyendo un formato en el que un Fab tiene un anticuerpo de dominio simple fusionado en C terminal de CH1. Por tanto, existe la necesidad de mejorar estos bsAbs en términos de eficiencia, vida mitad en suero y biodistribución.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a

1. Un formato de unión con el antígeno que consiste en:

- una primera proteína de fusión en la que el dominio constante CH1 de un anticuerpo está fusionado i) por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único y ii) por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único en donde el dominio constante CH1 de la primera proteína de fusión está fusionado por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único a través del espaciador DKT y,
- una segunda proteína de fusión en la que el dominio constante CL de un anticuerpo está fusionado por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único.

En particular, la invención se describe sus reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han creado ahora nuevos formatos de unión con el antígeno para aumentar la vida mitad en suero del formato bsAb original (54 kDa) descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO/2006/064136 mediante la fusión de un sdAb (*single domain antibody*: anticuerpo de dominio único) adicional al extremo C-terminal del dominio CH1 del motivo de heterodimerización C κ /CH1 (figura 1). Sorprendentemente, han demostrado que dicha fusión permite la producción de varios formatos funcionales de unión al antígeno que difieren en tamaño y valencia para los antígenos dirigidos. El hecho de que los sdAbs fusionados a través de su dominio N-terminal al dominio C-terminal de CH1 permanezcan activos es notable porque este extremo N-terminal está ubicado en la vecindad del sitio de unión con el antígeno. Podría haberse presentado un mayor impedimento estérico entre el antígeno y el motivo de heterodimerización. Sin embargo, los autores de la presente invención demostraron que se podían obtener formatos de unión al antígeno funcionales.

Formatos de unión a antígeno de la invención:

En consecuencia, la presente invención se refiere a

1. Un formato de unión al antígeno que consiste en:

- una primera proteína de fusión en la que el dominio constante CH1 de un anticuerpo está fusionado i) por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único y ii) por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único, en donde el dominio constante CH1 de la primera proteína de fusión está fusionado por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único a través del espaciador DKT y,
- una segunda proteína de fusión en la que el dominio constante CL de un anticuerpo está fusionado por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único.

La invención describe que el formato de unión a antígeno de la invención representa un formato heterodímero que reproduce el motivo de heterodimerización CL/CH1 de un anticuerpo clásico y permite así el plegado correcto de los formatos de unión con el antígeno de la invención en un contexto celular. La invención describe que el dominio constante CH1 de la primera proteína de fusión y el dominio constante CL de la segunda proteína de fusión están por tanto enlazados a través de un enlace disulfuro.

Según la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán igualmente en la presente invención. En los anticuerpos naturales, las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas, tales como la asociación de cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento y la unión a los receptores Fc. El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina que consiste en los dominios variables de una cadena ligera y una

cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están constituidos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinante de complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los recursos de regiones no hipervariables o de marco (FR) influyen en la estructura de dominio global y, por lo tanto, en el sitio de combinación. La CDR se refiere a secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Los dominios variables de cadena ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3, y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. FR se refiere a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de anticuerpo de una única composición de aminoácidos, que se dirige contra un antígeno específico y que es producida por un solo clon de células B o hibridomas. En consecuencia, el término "hibridoma" denota una célula, que se obtiene sometiendo una célula B, preparada inmunizando un animal con un antígeno, a una fusión celular con una célula de mieloma derivada de un ratón o similar que produce el anticuerpo monoclonal deseado que tiene una especificidad antigénica.

En una realización particular, los dominios constantes CH1 y CL de la invención son dominios constantes humanizados, y más preferiblemente dominios constantes CH1 y CL completamente humanos.

Por "humanizado" se entiende mutado de manera que la inmunogenicidad al tener lugar la administración en pacientes humanos es menor o inexistente. La humanización de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo murino o camélido), según la presente invención, comprende una etapa para reemplazar uno o más de los aminoácidos de dicho anticuerpo por su contraparte humana como se encuentra en la secuencia de consenso humana, sin que ese anticuerpo pierda su carácter típico, es decir, la humanización no afecta significativamente a la capacidad de unión con el antígeno del anticuerpo resultante.

En una realización en particular, el dominio CL es de una cadena ligera lambda (λ) o kappa (κ).

En una realización en particular, el dominio CH1 es de una IgG, como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Alternativamente, el dominio CH1 es de una IgA, IgD, IgE o IgM.

El dominio variable se selecciona entre anticuerpos de dominio único (sdAbs).

El término "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada único de anticuerpos del tipo que se puede encontrar en los mamíferos camélidos que están desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Tales VHH también se denominan "nanobody®". Según la invención, sdAb puede ser en particular sdAb de llama.

En una realización particular, el dominio de anticuerpo de dominio único (VHH) es humanizado.

Normalmente, el dominio variable puede dirigirse contra cualquier antígeno.

Por ejemplo, el dominio variable puede ser específico para una molécula reguladora de células inmunitarias como CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD26, CTLA-4, ICOS o CD11a. Otros antígenos adecuados incluyen, pero sin limitarse a ellos, los asociados con células inmunitarias que incluyen moléculas asociadas a células T, como TCR/CD3 o CD2: dianas asociadas a células NK como NKG2D, FcγRIIIa (CD16), CD38, CD44, CD56 o CD69; dianas asociadas a granulocitos tales como FcγRI (CD64), FcαRI (CD89) y CR3 (CD11b/CD18); dianas asociadas a monocitos/macrófagos (tales como FcγRI (CD64), FcαRI (CD89), CD3 (CD11b/CD18), o receptor de manosa; dianas asociadas a células dendríticas, como FcγRI (CD64) o receptor de manosa, y dianas asociadas a eritrocitos, como CR1 (CD35).

Alternativamente, el dominio variable según la invención puede dirigirse contra un antígeno de cáncer. Los antígenos de cáncer conocidos incluyen, sin limitación, c-erbB-2 (erbB-2 también se conoce como c-ncu o HER-2), que está particularmente asociado con células tumorales de mama, ovario y colon, así como neuroblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cánceres del tracto digestivo. Otra clase de antígenos del cáncer son las proteínas oncofetales de función no enzimática. Estos antígenos se encuentran en una variedad de neoplasmas y a menudo se denominan "antígenos asociados a un tumor". El antígeno carcinoembrionario (CEA) y la α -fetoproteína (AFP) son dos ejemplos de este tipo de antígenos de cáncer. Los niveles de AFP aumentan en pacientes con carcinoma hepatocelular: el 69% de los pacientes con cáncer de hígado expresan altos niveles de AFP en su suero. CEA es una glicoproteína sérica de 200 kDa que se encuentra en el adenocarcinoma de colon, así como en los cánceres de pulmón y del tracto genitourinario. Otra clase más de antígenos contra el cáncer son aquellos antígenos exclusivos de un tumor en particular, denominados a veces "antígenos específicos del tumor", como las proteínas de choque térmico (por ejemplo, las proteínas hsp70 o hsp90) de un tipo particular de tumor. Otros objetivos incluyen los ligandos MICA/B de NKG2D. Estas moléculas se expresan en muchos tipos de tumores, pero normalmente no en células sanas.

- Los ejemplos específicos adicionales de antígenos de cáncer incluyen la molécula de adhesión de células epiteliales (Ep-CAM/TACSTD1), mesotelina, glicoproteína 72 asociada a un tumor (TAG 72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas virales asociadas al cáncer (por ejemplo, antígenos del virus del papiloma humano), antígeno prostático específico (PSA, PSMA), RAGE (antígeno renal), CAMEL (antígeno reconocido por CTL en el melanoma), antígenos CT (como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE y SAGE), antígenos de mucina (p. ej., MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de gangliósidos asociados con el cáncer, tirosina, gp75, C-myc, Mart1, MelanA, MUM -1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM, proteínas de choque térmico derivadas de tumores, y similares (véase también, por ejemplo, Acres *et al.*, *Curr Opin Mol Ther* 2004 febrero, 6: 40-7; Taylor-Papadimitriou *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 8 de octubre de 1999; 1455 (2-3): 301-13; Emens *et al.*, *Cancer Biol Ther*. 2003 julio-agosto; 2 (4 Suppl 1): S161- 8; y Ohshima *et al.*, *Int J Cancer*. 2001 Jul. 1:93 (1): 91-6). Otras dianas de antígeno de cáncer ejemplares incluyen el antígeno similar al antígeno asociado al tumor CA 195 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 5.324.822) y los antígenos similares al carcinoma de células escamosas de orina femenina (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 5.306.811), y los antígenos de cáncer de células de mama descritos en la patente de EE.UU. n° 4.960.716.
- El dominio variable según la invención puede dirigirse a antígenos proteicos, antígenos de carbohidratos o proteínas glucosiladas. Por ejemplo, el dominio variable puede dirigirse a grupos de glucosilación de antígenos que son producidos preferentemente por células transformadas (neoplásicas o cancerosas), células infectadas, y similares (células asociadas con otros trastornos relacionados con el sistema inmunitario). En un aspecto, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor. En un aspecto ejemplar, el antígeno es O-acetilado-GD2 o glipican-3. En otro aspecto particular, el antígeno es uno de los antígenos de Thomsen-Friedenreich (TF) (TFA).
- El dominio variable según la invención también puede exhibir especificidad para una proteína asociada al cáncer. Tales proteínas pueden incluir cualquier proteína asociada con la progresión del cáncer. Los ejemplos de tales proteínas incluyen factores de angiogénesis asociados con el crecimiento tumoral, como los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor tisular (TF), los factores de crecimiento epidérmico (EGF), y receptores de los mismos; factores asociados con la invasividad; y otros receptores asociados con la progresión del cáncer (por ejemplo, uno de los receptores HER1-HER4).
- Alternativamente, el dominio variable según la invención puede ser específico para un virus, una bacteria o una diana asociada a parásitos. Por ejemplo, el dominio variable puede ser específico para una diana asociada con virus, como una proteína del HIV (por ejemplo, gp120 o gp41), CMV u otros virus, como el virus de la hepatitis C (HCV).
- El dominio variable según la invención también puede dirigirse a la albúmina o FcRn para aumentar la vida media de los formatos de unión a antígeno de la invención en la circulación sistémica.
- El dominio variable según la invención puede dirigirse alternativamente a un hapteno, y más en particular un hapteno de bajo peso molecular, y más preferiblemente a un hapteno de bajo peso molecular radiomarcado. Los haptenos de peso molecular según la invención pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en metotrexato, histamina succinilglicina, DTPA (ácido dietilen-triamino-pentaacético); DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético) y sus derivados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n° 4.885.363; 5.087.440; 5.155.215; 5.188.816; 5.219.553; 5.262.532 y 5.358.704 y D. Meyer *et al.*, *Invest. Radiol*. 1990, 25: S53-55). En una realización en particular, el hapteno está marcado con un radionucleido. Por ejemplo, los radionucleidos diagnósticos útiles incluyen, pero sin limitarse a ellos, ¹¹⁰In, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸F, ⁵²Fe, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁹Zr, ⁹⁴Tc, ¹⁵⁰Re, ¹⁸⁸Re u otros emisores de radiaciones gamma, beta o positrones. Los radionucleidos terapéuticos particularmente útiles incluyen, pero no se limitan a ellos, ¹¹¹In, ¹⁷⁷Lu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹¹At, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³³P, ⁴⁷Sc, ¹¹¹Ag, ⁶⁷Ga, ¹⁴²Pr, ¹⁵³Sm, ¹⁶¹Tb, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁶Ho, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁹Re, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se, ⁷⁷As, ⁸⁹Sr, ⁹⁹Mo, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁹Pd, ¹⁴³Pr, ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁹Er, ¹⁹⁴Ir, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au y ²¹¹Pb.
- Los dominios constantes y los dominios variables según la invención pueden prepararse fácilmente por un experto en la materia usando una experimentación rutinaria.
- Por ejemplo, los dominios constantes y los dominios variables según la invención pueden ser de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de interés pueden ser producidos por un animal (incluyendo, pero sin limitarse a ellos, seres humanos, ratones, camélidos, ratas, conejos, hámsteres, cabras, caballos, pollos o pavos), sintetizados químicamente, o expresados de forma recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse y aislarse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, entre otras, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de células B humanas (Cote *et al.*, 1983); y la técnica de hibridoma EBV (Cole *et al.* 1985). También se pueden usar otros métodos conocidos para producir líneas de células B transformadas que producen anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, producidas por la presentación de fago o por métodos combinatorios. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.223.409; y los documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; o WO 90/02809. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (p. ej. cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de clasificación por tamaño),

centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos pueden fusionarse con secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de alguna otra forma en la técnica, para facilitar la purificación. Finalmente, los genes que codifican el dominio constante o el dominio variable según la invención se pueden recuperar del ADN de hibridomas o fagos relevantes. En una realización particular, los anticuerpos monoclonales son anticuerpos totalmente humanos o anticuerpos humanizados.

Los scAbs se generan generalmente mediante la clonación por PCR del repertorio del dominio V del ADNc de la sangre, ganglios linfáticos o bazo obtenido de animales inmunizados en un vector de presentación de fago, como pHEN2. Los scAbs específicos de antígeno se seleccionan comúnmente mediante el *panning* de bibliotecas de fagos sobre antígeno inmovilizado, p. ej. antígeno recubierto sobre la superficie de plástico de un tubo de ensayo, antígenos biotinilados inmovilizados sobre esferas de estreptavidina, o proteínas de membrana expresadas en la superficie de las células. Sin embargo, tales scAbs muestran con frecuencia afinidades por su antígeno más bajas que los scAbs derivados de animales que han recibido varias inmunizaciones. La alta afinidad de los scAbs de las bibliotecas inmunitarias se atribuye a la selección natural de los sdAbs variantes durante la expansión clonal de las células B en los órganos linfoides de animales inmunizados. La afinidad de los sdAbs de bibliotecas no inmunes se puede mejorar a menudo imitando esta estrategia *in vitro*, es decir, mediante mutagénesis dirigida al sitio de las regiones CDR y rondas adicionales de *panning* en antígeno inmovilizado en condiciones de mayor rigor (temperatura más alta, concentración de sal alta o baja, pH alto o bajo y bajas concentraciones de antígeno). Los sdAbs derivados de camélidos se expresan y purifican fácilmente a partir del periplasma de *E. coli* a niveles mucho más altos que los correspondientes dominios de los anticuerpos convencionales. Los sdAbs generalmente muestran alta solubilidad y estabilidad y también pueden producirse fácilmente en células de levadura, plantas y mamíferos. Por ejemplo, las "patentes de Hamers" describen métodos y técnicas para generar VHH contra cualquier diana deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 5.800.988; patente de EE. UU. n° 5.874.541 y patente de EE. UU. n° 6.015.695). Las "patentes de Hamers" describen más concretamente la producción de sdAbs en huéspedes bacterianos como *E. coli* (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.765.087) y en huéspedes eucariotas inferiores, como los mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) o en levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (ver, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.838.254). En un anticuerpo específico, los sdAbs de la invención pueden humanizarse adicionalmente.

La invención describe que los dominios constantes CH1 y CL de las proteínas de fusión se fusionan directamente en sus extremos N-terminales al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único.

Como se usa en el presente documento, el término "directamente" significa que el aminoácido (primero o último) en el extremo terminal (extremo N- o C-terminal) del dominio constante se fusiona con el aminoácido (primero o último) en el extremo terminal (extremo N- o C-terminal) del dominio variable.

En otras palabras, en esta realización, la invención describe que el primer aminoácido del extremo N-terminal de dicho dominio constante CH1 o CL está unido directamente por un enlace covalente al último aminoácido del extremo C-terminal de dicho dominio variable de un anticuerpo.

La invención describe que el dominio constante CH1 de la primera proteína de fusión se fusiona por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único a través del espaciador DKT (SEQ ID NO: 30).

La secuencia DKT está presente de modo natural en el extremo C-terminal del dominio CH1 humano de anticuerpos.

La invención describe que los formatos de unión a antígeno de la invención tienen 3 dominios variables y puede por tanto ser mono-, bi- o tri-específico para los antígenos de interés. En consecuencia, cada dominio variable del formato de unión a antígeno según la invención tiene la capacidad de unirse a un antígeno por sí mismo. La unión a antígeno no es la misma que se observa clásicamente para la unión de un anticuerpo a un antígeno (la entidad responsable de la unión al antígeno es el complejo formado por los dominios variables VL y CH), sino que se aproxima a la misma que se observó para mamíferos camélidos: un dominio variable (VH, VL o VHH) puede unirse a un antígeno por sí mismo.

En algunas realizaciones, el formato de unión a antígeno de la invención puede ser monoespecífico cuando todos los dominios variables están dirigidos contra el mismo antígeno. Además, el formato de unión al antígeno de la invención puede ser biespecífico, cuando la combinación de dominios variables los hace dirigidos contra dos antígenos particulares (por ejemplo, CEA y CD16). Según esta realización, dicho formato de unión al antígeno es bivalente; es decir, dos de los tres dominios variables están dirigidos contra el mismo antígeno (por ejemplo, CEA o CD16). Además, el formato de unión al antígeno de la invención puede ser trispecífico, cuando la combinación de dominios variables los hace dirigidos contra tres antígenos particulares (por ejemplo, CEA, CD3 y CD16 o CEA, CD16, albúmina humana o CEA, CD3, albúmina humana).

En una realización particular, el formato de unión al antígeno de la invención es biespecífica, en donde dos dominios variables son específicos para un antígeno de cáncer (por ejemplo, CEA) y el último dominio variable es específico para una molécula reguladora de células inmunitarias (por ejemplo, CD16).

En una realización particular, la invención describe que el formato de la unión al antígeno de la invención es triespecífico, en donde un primer dominio variable es específico para un antígeno de cáncer (por ejemplo, CEA o cualquier antígeno de cáncer), un segundo dominio variable es específico para una primera molécula reguladora de células inmunitarias (por ejemplo, CD16), y un tercer dominio variable es específico para una segunda molécula reguladora de células inmunitarias (por ejemplo, CD3). Más en particular, la invención se refiere a un formato de unión al antígeno en el que un primer dominio variable es específico para un antígeno de cáncer, un segundo dominio variable es específico para una molécula de las células asesinas naturales (por ejemplo, CD16), y un tercer dominio variable es específico para una molécula de células T (por ejemplo, CD3), proporciona la ventaja de destruir células tumorales asesinas con más potencia al proporcionar el redireccionamiento a las células NK y a las células T. Dicho formato de unión con el antígeno contribuye también a la estimulación del sistema inmunitario adaptativo, porque potencialmente se podrían generar linfocitos T destructores del tumor, y se podría establecer la vacunación (es decir, la provisión de una respuesta inmunitaria a largo plazo y células de memoria que podrían generar rápidamente una respuesta nueva y eficiente en el caso de desarrollo de metástasis.

En una realización particular, la invención describe que el formato de unión del antígeno de la invención consiste en:

- 15 - una primera proteína de fusión que consiste en un dominio CH1 fusionado directamente por su extremo N-terminal a un anticuerpo de dominio único específico para CD16 y fusionado a través de un espaciador por su extremo C-terminal a un anticuerpo de dominio único específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) en donde dicho espaciador es DKT; y
- 20 - una segunda proteína de fusión que consiste en un dominio CL de una cadena ligera kappa (κ) fusionada directamente por su extremo N-terminal con un anticuerpo de dominio único específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA).

En una realización particular, la invención describe que un formato de unión de antígeno de la invención se representa mediante el formato 514-515 o 1214-1215 en la figura 1.

En una realización particular, la invención describe que el formato de unión del antígeno de la invención es triespecífico, en donde el primer dominio variable es específico para un antígeno de cáncer (por ejemplo, CEA), el segundo dominio variable es específico para una molécula reguladora de células inmunitarias (por ejemplo, CD16), y el tercer dominio variable es específico para la albúmina. Más en particular, la invención se refiere a un formato de unión al antígeno en el que un primer dominio variable es específico para un antígeno de cáncer, un segundo dominio variable es específico para una molécula de célula asesina natural (por ejemplo, CD16), y un tercer dominio variable es específico para una albúmina. La vida mitad del formato de unión al antígeno en la circulación sistémica puede así aumentar sin afectar a sus efectos de destrucción de células tumorales.

Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras recombinantes de la invención:

Otro objeto más de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un formato de unión a antígeno según las reivindicaciones.

35 Como se usa en el presente documento, una secuencia "que codifica" un producto de expresión, como un ARN, un polipéptido, una proteína o una enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia de codificación para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

40 Estas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica.

Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en un vector adecuado, como un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector viral.

45 Así pues, un objeto adicional de la presente invención se refiere a un vector y un casete de expresión en el que una molécula de ácido nucleico que codifica un formato de unión a antígeno de la invención está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular un promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y opcionalmente la traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácido nucleico según la invención. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación, o vectores de expresión.

50 Como se usa en este documento, los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

55 La invención describe que el vector es un vector bicistrónico que incluye dos moléculas de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una proteína de fusión del formato de unión al antígeno.

Se puede usar cualquier vector de expresión para células animales. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H *et al.* 1990), pAGE103 (Mizukami T *et al.* 1987), pHSG274 (Brady G *et al.* 1984), pKCR (O'Hare K *et al.* 1981), pSG1 beta d2- 4- (Miyaji H *et al.* 1990) y similares.

5 Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, como por ejemplo puC, pcDNA, pBR y similares.

10 Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, virus del herpes y vectores AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en este campo, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus colaboradores. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPcvt+, células 293, etc. Se pueden encontrar protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación, por ejemplo en los documentos WO95/14785, WO 96/22378, patente de EE.UU. nº 5.882.877, patente de EE.UU. nº 6.013.516, patente de EE.UU. nº 4.861.719, patente de EE.UU. nº 5.278.056 y documento WO 94/19478.

15 Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami T. *et al.* 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y *et al.* 1987), promotor (Mason JO *et al.* 1985) y potenciador (Gillies SD *et al.* 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

20 La invención incluye también sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que puede usarse en terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transferencia viral tales como los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus, que se utilizan convencionalmente en terapia génica. Esto también incluye sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo de administración de genes no viral. Los ejemplos de vehículos de administración de genes no virales incluyen liposomas y polímeros tales como polietileniminas, ciclodextrinas, polímeros de histidina/lisina (HK), etc.

25 Un sujeto de la presente invención es también una célula hospedadora procarionota o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico o vector según la invención (preferiblemente un vector bicistrónico como se describió antes).

30 El término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), en una célula hospedadora, de forma que la célula hospedadora exprese el gen o secuencia introducidos, para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducidos. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducidos ha sido "transformada".

35 En una realización en particular, para expresar y producir formatos de unión a antígeno de la invención, se escogerán células procarionotas, en particular células *E. coli*. En realidad, según la presente invención, no es obligatorio producir el formato de unión a antígeno de la invención en un contexto eucariótico que favorezca las modificaciones post-traduccionales (p. ej. glicosilación). Además las células procarionotas tienen la ventaja de producir proteína en grandes cantidades. Si se necesita un contexto eucariótico, las levaduras (p. ej. cepas de *saccharomyces*) pueden ser particularmente adecuadas ya que permiten la producción de grandes cantidades de proteínas. De otra forma, podrían usarse líneas de células eucariotas típicas, tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6, YB2/0 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones post-traduccionales correctas del formato de unión a antígeno de la invención.

40 En consecuencia, otro aspecto de la invención describe una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un formato de unión a antígeno según las reivindicaciones o un vector según las reivindicaciones.

45 La construcción de vectores de expresión según la presente invención, y la transformación de las células hospedadoras pueden llevarse a cabo usando técnicas convencionales de biología molecular. Los formatos de unión a antígeno de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, cultivando células transformadas genéticamente según la invención y recuperando el formato de unión a antígeno expresado por dicha célula, a partir del cultivo. Entonces, si es necesario, pueden purificarse por procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante precipitación fraccionada, en partículas precipitación con sulfato amónico, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc. En particular, pueden usarse métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes, para producir las proteínas según la presente invención.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir un formato de unión a antígeno de las reivindicaciones que comprenden la etapa que consiste en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada según la invención bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho formato de unión a antígeno; y (ii) recuperar el formato de unión a antígeno expresado.

55

Métodos terapéuticos y usos de la invención:

La presente invención proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas. Los formatos de unión a antígeno de la invención son de hecho particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer o enfermedades infecciosas.

5 Por tanto, un objeto adicional de la invención se refiere a un formato de unión a antígeno de la invención para su uso como medicamento.

Más concretamente, un aspecto de la invención se refiere a un formato de unión a antígeno de la invención para uso en el tratamiento de cáncer o enfermedades infecciosas.

10 En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o la condición a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o condición.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad infecciosa" pretende abarcar cualquier enfermedad que resulte de una infección mediada por un virus, una bacteria o un parásito. Por lo tanto, el término incluye, pero no se limita a ella, la infección con virus, como el virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, con parásitos como *Plasmodium falciparum* (agente causante de la malaria) o con bacterias como *mycobacterium tuberculosis*.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer" pretende abarcar tumores sólidos primarios y metastásicos, incluidos carcinomas de mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar y conductos biliares, intestino delgado, riñón, vejiga, urotelio, tracto genital femenino (incluyendo cérvix, útero y ovario, así como coriocarcinoma y enfermedad trofoblástica gestacional), tracto genital masculino (incluyendo próstata, vesículas seminales, testículos y tumores de células germinales), glándulas endocrinas (incluidas las glándulas tiroideas, suprarrenales e hipofisarias), y la piel, así como hemangiomas, melanomas, sarcomas (incluidos los que se originan en los huesos y tejidos blandos, así como el sarcoma de Kaposi) y tumores del cerebro, nervios, ojos, tales como astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas y meningiomas. El término cáncer también se relaciona con tumores procedentes de neoplasias malignas hematopoyéticas, así como las leucemias y los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar el cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad de formato de unión a antígeno según las reivindicaciones.

30 Como se usa en el presente texto, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto según la invención es un ser humano.

El formato de unión a antígeno de la invención puede ser administrado en forma de composición farmacéutica, como se define a continuación.

Preferiblemente, los formatos de unión a antígeno de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente efectiva.

35 La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente de los ingredientes activos de la invención para tratar el cáncer o la enfermedad infecciosa en una relación razonable de beneficio/ riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico.

40 Se entenderá que el uso diario total de los formatos de unión a antígeno de la invención será decisión del médico asistente, dentro del alcance del criterio médico acertado. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva, específico para cualquier sujeto en particular, dependerá de diversos factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción de los formatos de unión a antígeno específicos empleados; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con los formatos de unión a antígeno específicos empleados; y otros tipos de factores bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis de los formatos de unión a antígeno a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se haya logrado el efecto deseado.

50 Un planteamiento para la terapia y diagnóstico del cáncer también puede implicar el uso de un formato de unión a antígeno biespecífico según la invención, que tenga al menos un brazo que se une específicamente a un antígeno del cáncer y al menos otro brazo que se une específicamente a un hapteno de bajo peso molecular. En esta metodología, se administra el formato de unión al antígeno de la invención y se le permite dirigirse al antígeno del cáncer, y por tanto al tumor. Algún tiempo después, se administra un hapteno de bajo peso molecular radiomarcado, que al ser reconocido por la segunda especificidad del formato de unión al antígeno, también se localiza en el tumor.

En otra realización en particular, el formato de unión a antígeno según la invención puede actuar como un ligando para un receptor o canal celular. Por tanto, el formato de unión a antígeno según la invención puede representar un agonista, un agonista parcial o un antagonista para un receptor.

Métodos de diagnóstico y usos de la invención:

- 5 Los formatos de unión a antígeno de la invención pueden ser también particularmente adecuados para diagnosticar o controlar una enfermedad. Dicha enfermedad puede ser una cualquiera y puede seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que consiste en cánceres y enfermedades infecciosas.

10 Un aspecto adicional de la invención describe uso de un formato de unión a antígeno de la invención para diagnosticar o controlar una enfermedad que puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cánceres y enfermedades infecciosas.

En una realización particular, los formatos de unión a antígeno de la invención pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. En la técnica se sabe que los marcadores proporcionan generalmente una señal (directa o indirectamente).

- 15 Como se usa en este documento, se entiende que el término "marcado", en relación con el anticuerpo, abarca el marcado directo del anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, la unión física) al anticuerpo de una sustancia detectable, como un agente radioactivo o un fluoróforo (p. ej., isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)), así como el etiquetado indirecto del anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable.

20 Un formato de unión a antígeno de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen, pero no se limitan a ellas, átomos radiactivos para estudios escintigráficos, como I123, I124, In111, Re186, Re188. Los formatos de unión a antígeno de la invención también pueden marcarse con una etiqueta de spin para imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen de resonancia magnética, IRM), como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

- 25 Una "muestra biológica" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de seguimiento. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a ellas, muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, como especímenes de biopsias específicas o cultivos de tejidos o células derivadas de ellas, y su progenie. Por ejemplo, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de una muestra de tejido obtenida de un individuo sospechoso de tener una enfermedad cancerosa. Por lo tanto, las muestras biológicas abarcan muestras clínicas, células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido.

30 Los formatos de unión a antígeno de la invención pueden ser útiles para el estadiaje de enfermedades cancerosas (por ejemplo, en radioimagen).

Composiciones farmacéuticas y kits de la invención:

- 35 La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden formatos de unión a antígeno de la invención.

Por tanto, los formatos de unión a antígeno de las reivindicaciones pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

- 40 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptables" se refiere a las entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otra reacción inconveniente cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga no sólida, semisólida o líquida no tóxica, un diluyente, un material de encapsulación o un auxiliar de formulación de cualquier tipo.

- 45 La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular, y similares.

- 50 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares y mezclas de dichas sales), o secas, especialmente composiciones liofilizadas que, dependiendo del caso, la adición de agua esterilizada o solución salina fisiológica permite la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.

5 Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad efectiva del formato de unión a antígeno puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones, que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una capacidad de uso fácil de jeringas. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un agente tensioactivo, como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden también prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 Un formato de unión a antígeno de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

25 El vehículo también puede ser un solvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

30

35 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando la cantidad requerida de los compuestos activos en el solvente apropiado con algunos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según el caso, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional que se desee, de una solución del mismo sometida previamente a una filtración estéril.

40 También se contempla la preparación de soluciones más concentradas, o altamente concentradas, para inyección directa, donde se contempla el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, que suministra altas concentraciones de los agentes activos a un área tumoral pequeña.

45 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármacos y similares.

50 Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido debe primero hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En conexión con esto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, podría disolverse una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclasia o inyectarse en el lugar propuesto para la infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación tendrá lugar necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto en concreto.

55

Los formatos de unión a antígeno de la invención pueden formularse dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 1,0 miligramos, o de

aproximadamente 0,01 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 miligramos o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

En ciertas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de formatos de unión a antígeno en células hospedadoras. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.

Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga de polímeros intracelulares, tales partículas ultrafinas (con un tamaño aproximado de 0,1 μm) se diseñan generalmente utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Para su uso en la presente invención se contemplan nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen estos requisitos, y dichas partículas pueden obtenerse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que, una vez dispersados en un medio acuoso, forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros que van desde 25 nm a 4 μm . La sonicación de MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el margen de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

La invención también describe *kits* que comprenden al menos un formato de unión a antígeno de la invención. Los *kits* que contienen los formatos de unión a antígeno de la invención encuentran uso en métodos terapéuticos o ensayos de diagnóstico.

La invención se ilustrará más detalladamente mediante las figuras y ejemplos que siguen. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

25 Figuras

Figura 1: Representación de varios formatos de anticuerpo biespecíficos.

Figura 2: Experimentos de citometría de flujo demostrando una afinidad aparente más alta de anticuerpos biespecíficos bivalentes (bbsAb) frente a monovalentes (bsFab). CEA: células MC38-CEA CD16: células Jurkat-CD16.

Figura 3: Ensayos de citotoxicidad *in vitro* realizados por citometría de flujo utilizando células NK humanas y anticuerpos biespecíficos.

Ejemplo:

Materiales y métodos

1/Construcción de los nuevos formatos

p501 (SEQ ID NO: 9): Inserción del gen sdAb 17 anti-CEA (Behar, G., Chames, P., Teulon, I., Cornillon, A., Alshoukr, F., Roquet, F., Pugnieri, M., Teillaud, J.-L., Gruaz Guyon, A., Pelegrin, A. y Baty, D "Llama single domain antibodies directed against non-conventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen (CEA) absent from non-specific cross-reacting antigen (NCA)". FEBS J. 2009, 276, 3881 - 93) de pHen1-CEA17 (SEQ ID NO: 10) en p1 (SEQ ID NO: 11) en el extremo C-terminal del dominio CH1 (sitio Not I):

PCR: 5 ng pHen1-CEA17 (SEQ ID NO: 10), 0.5 U Taq Polymerase Deep-vent (New England Biolabs), 10 μM de cebador 5' Not VHH y cebador 3' Not VHH rev, 5 μL Tp 10X, 1 μL MgSO_4 1 mM, 4 μL dNTP 2,5 mM, H_2O hasta 50 μL , 94 °C 3 min., 94 °C 45 s., 60 °C 45 s., 72 °C 45 s. x 35 ciclos, 72 °C 10 min.

Cebador 5' ' Not WHH Not

SEQ ID NO 1:

CCACGATTCTGCGGCCGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG

45 Cebador 3' No VHH rev

SEQ ID NO 2:

TTTTTGTCTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGG

ES 2 735 981 T3

El fragmento de PCR se purificó en gel de agarosa al 2% usando el *kit* NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) y se eluyó en 50 µL de tampón NE.

5 La digestión de p1 (SEQ ID NO: 11) (5 µg) por Not I (50 U), 30 µL de tampón 3 10x, 30 µL de BSA 10 mg/ml, H₂O hasta 300 µl 1 h a 37 °C, seguido de desfosforilación usando 10 U de CIP (Biolabs), 30 min a 37 °C. El CIP se inactivó usando 9 µl de EDTA 0,5 M 1 h a 65 °C, se trató con fenol y se precipitó 16 h a -20 °C usando 1 volumen de NaOAc 0,3 M y 3 volúmenes de etanol al 96%, seguido de 10 min de centrifugación a 16.000 g, lavado del sedimento usando 750 µl de etanol al 70%. El sedimento seco se resuspendió en 20 µl de H₂O.

10 Se digirió el fragmento de PCR (20 µl) utilizando NotI (100 U) (30 µl tampón 3 10X, 30 µl BSA 10 mg/ml, H₂O hasta 300 µl 1 h a 37 °C). Después del tratamiento con fenol, el fragmento de PCR digerido se precipitó a 16 °C y -20 °C usando 1 volumen de NaOAc 0,3 M y 3 volúmenes de etanol al 96%, seguido de centrifugación durante 10 min a 16.000 g, lavado del sedimento usando 750 µl de etanol al 70%. El sedimento seco se resuspendió en 20 µL de H₂O.

Ligación: 120 ng del vector p1 (SEQ ID NO: 11) y 60 ng de fragmento de PCR utilizando 10 U de ligasa (Biolabs), 1 µl de tampón 10X, H₂O hasta 10 µl, 1 h a temperatura ambiente, 10 min a 65 °C.

15 Tres µl de la ligación se sometieron a electroporación en 40 µl de células TG1 electrocompetentes. Las células se resuspendieron en 1 ml de SOC, 1 h a 37 °C, se agitaron a 180 rpm y se colocaron en discos de LB/ampicilina.

Se realizaron dos (2) series de PCR de colonia en 48 colonias para verificar el evento de ligación.

PCR1:

Cebador 5' M13 inversa

SEQ ID NO 3:

20 CAGGAAACAGCTATGAC

y

Cebador 3' Hind III+40

SEQ ID NO 4:

GCTGAAAATCTTCTCTCATCCG

25 PCR2:

Cebador 5' Flag

SEQ ID. NO 5:

GCAGGTGATTACAAAGACGATG

y

30 Cebador 3' Not VHH rev (SEQ ID NO: 2)

(0,25 U Dynazyme II (Finnzyme), 2,5 µL de tampón 10X, 10 mM dNTP, H₂O hasta 25 µL, 94 °C 3 min., 94 °C 45 s., 60 °C 45 s., 72 °C 45 s. x 35 ciclos, 72 °C 10 min).

Se sometieron a ensayo cuatro clones positivos en relación con la expresión: inducción 12 h a 30 °C, IPTG 100 µM, carga de lisado celular en SDS-PAGE al 15% y transferencia Western utilizando 9E10-HRP diluido 1/100).

35 Se comprobaron las secuencias (Millegen).

p514 (SEQ ID NO: 12): Inserción del fragmento NheI/HindIII de p501 (SEQ ID NO: 9) en p14 (SEQ ID NO: 13):

10 µg de cada vector se digirieron en 10 µl de tampón 2 10x , 10 µl de BSA (10 mg/ml) 20 U NheI, 20 U de HindIII, H₂O hasta 100 µl, 1 hora a 37°C. Se desfosforiló p14 (SEQ ID NO: 13) y se resuspendió en TE (véase anteriormente).

40 Los fragmentos se purificaron en gel como se indicó anteriormente utilizando NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) y se eluyeron con 25 µl de H₂O Los fragmentos se ligaron y la ligación se electroporó como anteriormente.

Se realizó PCR de colonias con los cebadores 5' sigpelbfor (SEQ ID NO 6: TACCTATTGCCTACGGCAGCC) y 3' HindIII + 40 (SEQ ID NO 4), 0,25 U Dynazyme II (Finnzyme), 2,5 µl de tampón 10X, 4 µl dNTP 2,5 mM, H₂O hasta 25 µl, 94 °C 3 min, 94 °C 1 min 30 s, 60 °C 1 min 30 s, 72 °C 1 min. 30 s. x 35 ciclos, 72 °C 10 min. Se analizaron cuatro clones positivos para determinar la expresión como antes, y se verificaron las secuencias (Millegen).

p515 (SEQ ID NO: 14): Inserción del fragmento NheI/Hin dIII de p501 (SEQ ID NO: 9) en p15 (SEQ ID NO: 15):

Como para p514.

p1201 (SEQ ID NO: 16): Mutación del espaciador AAA a DKT en p501 (SEQ ID NO: 9):

5 QuikChange en p501 (SEQ ID NO: 9) usando 125 ng de cada cebador, 5 µl de tampón 10X, 4 µl de dNTP 2,5 U Pfu Ultra (Stratagene), H₂O hasta 50 µl, 95 °C, 1 min, 95 °C, 30 s, 55 °C, 1 min, 68 °C, 7 min, x 18 ciclos, añadir 40 U de Dpn I.

Cebador 5' 1201 para

SEQ ID NO: 7:

GTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAGTGGTGCAGCTGGTGG

10 Cebador 3' 1201rev

SEQ ID NO 14:

CCACCAGCTGCACCTCAGTTTTGTCACAAGATTTGGCTCAAC

La transformación se realizó por electroporación en el DH5α utilizando 2 µl de producto QuikChange.

Se examinaron clones para determinar la expresión como antes y se comprobaron las secuencias.

15 p1214 (SEQ ID NO: 17): Inserción del fragmento Nhe I/HindIII de p1201 (SEQ ID NO: 16) en p14 (SEQ ID NO: 13):

Digerir 1 µg de p14 (SEQ ID NO : 13) y 15 µg de p1201 (SEQ ID NO: 16) por NheI 20 U para p14 (SEQ ID NO: 8) y 60 U para p1201 (SEQ ID NO: 16) y HindIII 20 U para p14 y 60 U para p1201 usando tampón 21X final H₂O hasta 50 µl, 2 h a 37 °C, desfosforilar el vector 14 añadiendo 10 U de CIP, 30 min a 37 °C, agregar 1,5 µl EDTA 0,5M, seguido de extracción con fenol, precipitar con etanol y resuspender en 20 µl de H₂O.

20 Fragmento de purificación en gel de p1201 (SEQ ID NO: 16) usando NucleoSpin Extract II

Ligación usando varias relaciones de vectores: insertar, usando 10 µl de Tampón 2X, 3 U T4 ADN ligasa (Promega), H₂O hasta 50 µl, 15 min temperatura ambiente, 15 min a 65 °C, precipitado con etanol y resuspender en 4 µl de H₂O.

Electroporación con 40 µl de DH5α utilizando 4 µl de ligación, poner en placa en discos Petri LB/Ampi de 100 µg/ml.

Los clones se ensayaron para determinar su expresión como antes y se comprobaron las secuencias.

25 p1215 (SEQ ID NO: 18): como para p1214 (SEQ ID NO: 17) pero usando p15 (SEQ ID NO: 15):

2/Producción y purificación de Abs

2.1 Producción en *E. coli*

30 La cepa K12 *E. coli* DH5α se utilizó para la producción de Ab. En primer lugar, se inoculó una colonia única que contenía el plásmido de interés en 50 ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. Las bacterias se cultivaron a 30 °C y se agitaron a 205 rpm durante la noche. Cuatrocientos ml de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina se inocularon con el cultivo anterior para obtener una OD_{600nm} de 0,1. Las bacterias se cultivaron a 30 °C durante 2 h 30, a continuación a 20 °C a una OD_{600nm} de 0,8 - 1. La producción de Abs se indujo mediante la adición de IPTG 0,1 mM (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) durante 60 horas a 20 °C.

2.2 Extracción de la fracción soluble del periplasma

35 Las células se recogieron mediante centrifugación a 1860 g durante 30 minutos a 4 °C. El sedimento se resuspendió vigorosamente en 4 ml de tampón TES frío pH 8,0 (Tris HCl 0,2 M pH 8, EDTA 0,5 mM, sacarosa 0,5 M) antes de agregar 1,6 mg de solución de lisosima recién preparada. A continuación, las células se sometieron a un choque osmótico mediante la adición de 8 ml de tampón TES frío y 8 ml de agua fría. Después de una incubación de 30 min en hielo, se agregaron 250 µg de ADNasa I (Roche) y 250 µl de MgCl₂ 1 M y la mezcla se incubó adicionalmente
40 durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 1860 g durante 1 hora a 4 °C. Después de la adición de una tableta de un cóctel inhibidor de proteasa, Completo libre de EDTA (Roche) en 50 ml de sobrenadante, el sobrenadante se dializó durante 16 horas a 4 °C contra un tampón de acetato de sodio 50 mM pH 7,0 que contenía NaCl 0,1 M.

2.3 Purificación de Abs

45 Purificación por cromatografía de afinidad con cobalto.

Después de la filtración en un filtro de 0,2 µm (Millipore), el sobrenadante se cargó en una columna de 2 ml BD Talon™ Metal Affinity (BD Biosciences Clontech) previamente equilibrada en un tampón de acetato sódico 50 mM pH 7,0 que contiene NaCl 0,1 M. La columna se lavó con 5 volúmenes de tampón de acetato sódico 50 mM, pH 7,0 que contenía NaCl 1 M, luego con 5 volúmenes de tampón de acetato de sodio 50 mM pH 7,0 que contenía NaCl 0,1 M. La elución se llevó a cabo por un gradiente de imidazol lineal (0 a 250 mM). El perfil de elución se siguió espectrofotométricamente a 280 nm. Las fracciones purificadas se analizaron por SDS PAGE al 12% teñidas con azul de Coomassie y transferencia western utilizando un anticuerpo anti c-myc-HRP (1 µg/ml, Santa Cruz Biotechnologies) y un anticuerpo anti-flag-HRP (0,5 µg/ml Sigma).

Purificación por cromatografía de afinidad en Proteína G

Las fracciones que contenían Abs se agruparon, se dializaron frente a tampón de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 1,2 mM, 1,76 mM KH₂PO₄ pH 7,4) y se cargaron en una columna de Proteína G Hi-Trap de 1 ml (Amersham Biosciences). Después de lavar la columna con 5 volúmenes de PBS, los anticuerpos se eluyeron con un tampón de glicina HCl 0,1 M a pH 2,7 y se neutralizaron mediante la adición de 1/10 volúmenes de tampón Tris-HCl 1 M pH 9,0. El perfil de elución se siguió espectrofotométricamente a 280 nm. La purificación de Abs fue seguida por SDS PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y transferencia western. Las fracciones de interés se agruparon, se lavaron en PBS y se concentraron en dispositivos Vivaspin (valor de corte 5 kDa, Millipore).

Las concentraciones de Ab se determinaron por el método colorimétrico de Lowry usando el *kit* de ensayo de proteínas Biorad. Los Abs se diluyeron con un volumen de glicerol y se almacenaron a -20 °C.

3/Experimentos de citometría de flujo

La unión de bsAb a CEA se evaluó utilizando células MC38-CEA. La unión de anticuerpos a CD16A se evaluó utilizando células Jurkat-CD16A. Se distribuyeron células (5x10⁵ células/pocillo) en una microplaca de 96 pocillos con fondo en V y se incubaron con diversas concentraciones de anticuerpos (0,82 a 200 nM) durante 1 hora a 4 °C. Todas las diluciones de células y anticuerpo se realizaron en BSA al 1% en PBS. Los anticuerpos unidos se tiñeron mediante el anticuerpo 9E10 anti c-myc monoclonal de ratón (4 µg/ml, (Santa Cruz, Biotecnología) para la unión de CEA o el anticuerpo anti-flag M2 de ratón (1 µg/ml, Sigma) para la unión a CD16A, seguido de anticuerpo anti-ratón-FITC de cabra F(ab')₂ (7 µg/mL, Beckman Coulter). Después de varios lavados con BSA al 1% de PBS, las células marcadas se resuspendieron suavemente en 200 µl de BSA al 1% de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences). Los resultados se analizaron con los programas CellQuest Pro (BD Biosciences) o Flowjo (Trestart Inc.).

4/Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

4.1 Aislamiento de PBMC (Células mononucleares de sangre periférica)

Se recuperó una bolsa de sangre (400 ml) de un donante sano en el EFS (Etablissement Français du Sang, Marsella, Francia). La sangre se diluyó a la mitad en FCS al 1% en PBS y se distribuyó en tubos de separación de sangre (PAA) previamente rellenos con separación por gradiente (LSM 1077 Lymphocyte, PAA). Los tubos se centrifugaron durante 40 minutos a 400 g a temperatura ambiente sin aceleración y sin freno. Se recuperó el anillo opaco en la interfase entre el plasma y la separación de gradiente que contenía PBMC. Las células se lavaron dos veces con FCS al 1% en PBS y se centrifugaron 20 minutos a 150 g a temperatura ambiente. Después se contaron las células en células Malassez y se resuspendieron en FCS al 1% en DMSO, y se congelaron en nitrógeno o se usaron para ensayos posteriores.

4.2 Purificación de células NK

La selección de células NK (Natural Killers: destructoras naturales) se realizó por agotamiento negativo utilizando el *kit* de aislamiento de células NK (Milteny Biotec) de PBMC de donantes sanos según las indicaciones de los fabricantes.

Cien millones de PBMC previamente aisladas se resuspendieron en 400 µl de tampón frío (BSA al 0,5% en PBS EDTA 2 mM). Las células se incubaron con 100 µl de un cóctel de anticuerpos: cóctel de anticuerpos con células NK de biotina, 10 minutos en hielo. Después de la adición de 300 µl de tampón frío, las células se incubaron con 200 µl de perlas magnéticas: microperlas de cóctel de células NK, 15 minutos en hielo. Las células se lavaron entonces con 10 ml de tampón y luego se resuspendieron en 500 µl de tampón. La suspensión celular se cargó en la columna MACS LS puesta en un campo magnético de un Separador MAC y se lavó con 9 ml de tampón. Las células NK sin marcar se recogieron, se contaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 10% FCS.

4.3 Ensayo de citotoxicidad por citometría de flujo

El ensayo de citotoxicidad por citometría de flujo cuantifica la lisis de células diana positivas para CEA inducida por células CD16+ como las células NK de donantes sanos bajo la acción de bsAb.

4.4 Marcaje de células diana con CFSE

Cinco millones de células diana CEA+ (MC38-CEA) se lavaron dos veces en BSA al 1% en PBS antes de la adición de CFSE (éster succinimidil carboxifluoresceína) a una concentración final de 5 µM en 1 ml de BSA al 1% en PBS durante 10 min en baño de agua a 37 °C. La reacción se detuvo luego añadiendo un exceso de BSA en PBS al 1% frío. Las células se lavaron dos veces en medio de cultivo de FCS al 10% en RPMI.

- 5 Se incubaron células diana marcadas con CFSE (20.000 células en 100 µL por pocillo) con diversas concentraciones de anticuerpos (1.000 pM a 0,01 pM). Cada punto se hizo por triplicado. Las células NK recién aisladas de PBMC se añadieron después a una relación efector/diana de 10/1. La placa se centrifugó a 560 g durante 30 s y se incubó a 37 °C durante 12 h.

- 10 Las células se recuperaron y se lavaron dos veces en BSA al 1% en PBS y se incubaron durante 5 minutos con 100 µl de 2 nM To-pro3. Después de la adición de 100 µl de BSA al 1% en PBS, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences). La lisis de las células diana se midió posteriormente por la liberación de un marcador intracelular mediante un contador de centelleo o espectrofotometría. Las células objetivo muertas se identificaron como células CFSE+ /To-pro 3+.

% de lisis = (% Diana+NK+Ab - % Diana+NK)/(100 - % Diana+NK) x100.

- 15 Resultados:

La modularidad de los anticuerpos de dominio único combinado con el uso del motivo de heterodimerización humana constituido por los dominios CH1/Ck permite la eficiente generación de anticuerpos recombinantes multivalentes y/o multiespecíficos. Anteriormente, los autores de la presente invención han demostrado la posibilidad de producir constructos monovalentes biespecíficos activos denominados bsAb (véanse la Figura 1 y el documento WO/2006/064136) que permiten la eficiente reorientación y activación de células efectoras tales como células NK humanas y macrófagos hacia células tumorales, lo que lleva a su lisis.

25 En estos constructos, los sdAbs se unieron a las extremidades N-terminales de los dominios CH1 y Ck por sus extremidades C-terminales. En este trabajo, los autores querían establecer la posibilidad de enlazar el extremo N-terminal del sdAb al término C del dominio CH1 para crear moléculas biespecíficas multivalentes. Así se construyeron varias moléculas correspondientes a la adición de un dominio anti-CEA al formato bsAb original. El término N de sdAbs se encuentra en la punta del dominio, es decir, próximo a la interfase de unión al antígeno. Para evitar posibles choques estéricos, se investigó el efecto de la adición de pequeños espaciadores (3 residuos, AAA o DKT). Una representación de estos diversos formatos nuevos se muestra en la Figura 1.

30 Todas estas moléculas se produjeron en el periplasma de *E. coli* para permitir una formación adecuada de uniones disulfuro dentro de cada dominio de Ig y se purificaron después de la extracción del periplasma utilizando un procedimiento de dos etapas común, es decir, cromatografía de afinidad con metales seguida de purificación con proteína G.

35 Dos de las nuevas moléculas, es decir, 1214 (SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26) y 1215 (SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28) se compararon con sus moléculas originales monovalentes (14 y 15) elegidas para demostrar un efecto de avididad debido a la adición de un dominio anti-CEA extra, utilizando citometría de flujo en células diana CEA+.

La Figura 2 muestra claramente que los constructos bivalentes 1214 y 1215 dieron señales más altas que sus moléculas originales, especialmente a baja concentración. En conjunto, estos resultados demuestran que el dominio único añadido en el término C de CH1 puede acceder y unir eficazmente su antígeno mostrado en la superficie de la célula.

40 La capacidad de estas nuevas moléculas para reorientar las células efectoras hacia las células diana CEA+ se demostró utilizando un ensayo de citotoxicidad *in vitro* basado en citometría de flujo. Las células diana CEA+ se marcaron con fluorescencia usando CFSE y se mezclaron con células NK humanas en una relación efector: diana de 10:1 en presencia de varias concentraciones de moléculas biespecíficas monovalentes (14 y 15) o bivalentes (1214 y 1215). Como se muestra en la figura 3, todas las moléculas mostraron una actividad similar en este ensayo con valores de EC₅₀ en el margen pM.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> Formatos de unión a antígeno para uso en tratamientos terapéuticos o ensayos diagnósticos

<130> BIO09484 BATY/MC

<160> 30

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 42

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador 5' Not VHH

20 <400> 1

ccacgattct gcggccgcag aggtgcagct ggtggagtct gg 42

<210> 2

<211> 38

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador 3' Not VHH rev

<400> 2

ttttgttct gcggccgctg aggagacggt gacctggg 38

35 <210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador 5' M13 Inversa

<400> 3

caggaaacag ctatgac 17

45 <210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

50 <220>

<223> Cebador 3' Hind III+40

<400> 4

55 gctgaaaatc ttctctcatc cg 22

<210> 5

<211> 22

<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador 5' Flag

65 <400> 5

gcaggtgatt acaaagacga tg 22

ES 2 735 981 T3

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 5' sigpelbfor

 10 <400> 6
 tacctattgc ctacggcagc c 21

 <210> 7
 <211> 43
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 5' 1201for
 20
 <400> 7
 gttgagccca aatctgtga caaaactgag gtcagctgg tgg 43

 <210> 8
 25 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador 3' 1201rev

 <400> 8
 ccaccagctg cacctcagtt ttgcacaag attgggctc aac 43

 35 <210> 9
 <211> 6536
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> p501

 <400> 9
 cctgaattga ctctottccg ggcgctatca tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc 60

 gatggtgtca acgtaaattgc atgccgcttc gccttcgctc gcgaattgca agctgatccg 120

 gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180

 45 ggtatggctg tgcaggctgt aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgcactccc 240

ES 2 735 981 T3

ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
 ctgttgacaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc 360
 acacaggaaa cagaattcca tatgaaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
 ttgctcgctg cgcagccggc catggcccag gtcaccgtct cctcacgtac ggtggctgca 480
 ccctctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt 540
 gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 600
 gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc 660
 tacagcctca gcagaccct gacgtgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac 720
 gcctgcgaag taccatca gggcctgagc tcgccgtga caaagagctt caaccgcgga 780
 gagtgtgcag gtgattacaa agacgatgac gataagtaat aacaggaaa cagaagtcca 840
 tatgaaatac ctattgccta cggcagccgc tggattgta ttactcgcgg cccagccggc 900
 catggccgct agcaccaagg gccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac 960
 ctctgggggc acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac 1020
 ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca 1080
 gtcctcagga ctctactccc tcagcagcgt agtgaccgtg ccctccagca gcttgggac 1140
 ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt 1200
 tgagcccaaa tcttgtgcgg ccgcagaggt gcagctggtg gagtctgggg gaggcttctg 1260
 gcagcggggg gaatctctga cgctctcctg tacaagttct aactgacct tcaactccgta 1320
 tcgcatggcc tggtagcggc aggtccagg gaagcagcgt gatthagtgc cggatattag 1380
 tagtggatg ggtaggacca caaactatgc ggacttcgag aaggccgat tcaccatctc 1440
 cagagacaac atcaagaaca cggctctttc gcgaatgact aacctgaaac ctgaggacac 1500
 ggccgtctac tactgtaaca ccttcgtttc gtttgtgggg attgagcgtt cttggggcca 1560
 ggggaccag gtcactgtct cctcagcggc cgcagaacaa aaactcatct cagaagagga 1620
 tctgaatggg gccgtacatc accaccatca tcatgggagc taagcttctg ttttggcggg 1680
 tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa 1740
 cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa 1800
 gtgaaacgcc gtagcggcga tggtagtgtg ggtctcccc atgcgagagt agggaactgc 1860
 caggcatcaa ataaaaagaa aggtcagtc gaaagactgg gccttctgtt ttatctgttg 1920
 tttgtcgggtg aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccc ggagcggatt tgaacgttgc 1980
 gaagcaacgg cccggaggac cctggcgggc aggacgccc ccataaactg ccaggcatca 2040
 aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cttttttgag tttctacaaa ctcttttgtt 2100
 tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccg tgataaatgc 2160

ES 2 735 981 T3

ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc 2220
 ccttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa 2280
 aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg 2340
 gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaag 2400
 ttctgctatg tggcgcggtg ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc 2460
 gcatacacta ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta 2520
 cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aacctgagt gataaactg 2580
 cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca 2640
 acatggggga tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac 2700
 caaacgcgca gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgctg cgcaaactat 2760
 taactggcga actacttact ctgcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg 2820
 ataaagttag aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc tggctggttt attgctgata 2880
 aatctggagc cggtgagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta 2940
 agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa 3000
 atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag 3060
 tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg 3120
 tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aatccctta acgtgagttt tcgttccact 3180
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgg 3240
 taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 3300
 aagagctacc aactcTTTTT ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 3360
 ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgcta 3420
 catacctcgc tctgctaatc ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 3480
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg 3540
 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac 3600
 agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 3660
 taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgc caagggagct tccagggga aacgcctggt 3720
 atctttatag tctgtcggg tttcgcacc tctgactga gcgtcgattt ttgtgatgct 3780
 cgtcaggggg cgggagccta tggaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg 3840
 ccttttgctg gccttttgct cacatgttct ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata 3900
 accgtattac cgcctttgag tgagctgata ccgctcgcg cagccgaac accgagcgc 3960
 gcgagtcagt gagcggagaa gcggaagagc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcac 4020

ES 2 735 981 T3

tgtgcggtat ttcacaccgc atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc 4080
 atagttaagc cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gggatcatggc tgcgccccga 4140
 caccgcgcaa caccgcgtga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac 4200
 agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacacccg 4260
 aaacgcgcga ggcagctgcg gtaaagctca tcagcgtggt cgtgaagcga ttcacagatg 4320
 tctgcctggt catccgcgtc cagctcgttg agtttctcca gaagcgttaa tgtctggctt 4380
 ctgataaagc gggccatggt aagggcgggt ttttctggtt tggctcacttg atgcctccgt 4440
 gtaaggggga atttctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca 4500
 cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc ggttactgga acggttgtag ggtaaacaac 4560
 tggcgggatg gatgcggcgg gaccagagaa aaatcactca gggatcaatgc cagcgccttcg 4620
 ttaatacaga tgtaggtggt ccacagggta gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga 4680
 acataatggt gcagggcgct gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga 4740
 agaccattca tgtttgtgct caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc 4800
 gctcgcgtat cgggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg 4860
 tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga 4920
 tgcgcgcgct gcggctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg 4980
 tttgcgcatt cacagtctc cgaagaatt gattggctcc aattcttgga gtggtgaatc 5040
 cgtagcgag gtgccgccgg cttccattca ggtcagggg gccccgctcc atgcaccgcg 5100
 acgcaacgcg gggaggcaga caaggtatag ggcggcgctt acaatccatg ccaaccggtt 5160
 ccatgtgctc gccgagggcg cataaatgc cgtgacgatc agcgggtccag tgatcgaagt 5220
 taggtcggta agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatggtcgt catctacctg 5280
 cctggacagc atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat 5340
 aatggggaag gccatccagc ctgcgctcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc 5400
 ggccagcttg caattcgcgc taacttacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 5460
 agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 5520
 gtttgcgtat tgggcgccag ggtggttttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga 5580
 ttgcccttca ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc 5640
 agcaggcgaa aatcctggtt gatggtggtt gacggcggga tataacatga gctgtcttcg 5700
 gtatcgtcgt atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg 5760
 gcgcgcattg cgcgccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt ggaacgatg 5820
 ccctcattca gcatttgcgt ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc 5880
 cgttccgcta tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc 5940

ES 2 735 981 T3

agacgcgccg agacagaact taatggtccc gctaacagcg cgatttgctg atgaccaat 6000
gcgaccagat gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg 6060
atgggtgtct ggtcagagac atcaagaaat aacgccgga cattagtgca ggcagcttcc 6120
acagcaatgg catcctggtc atccagcggg tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc 6180
gcgagaagat tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac 6240
accaccaacg tggcaaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac 6300
ggcgcgtgca gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc 6360
agttgtgtg ccacgcggtt gggaatgtaa ttcagctccg ccatcgccgc ttccactttt 6420
tcccgcgttt tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa 6480
gagacaccgg catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccac 6536

<210> 10
<211> 4848
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> pHen1-CEA17

10

<400> 10
agcgcaccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc 60
acgacaggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc 120
tcactcatta ggcaccccag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa 180
ttgtgagcgg ataacaatct cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccaaagcttg 240
catgcaaatt ctatctcaag gagacagtca taatgaaata cctattgcct acggcagccg 300
ctggattggt attactcgcg gccagcccg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg 360
ggggaggctt cgtgcaggcg ggggaatctc tgacgctctc ctgtacaagt tctacactga 420
ccttcaactc gtatcgcgat gcctggtacc gccaggctcc agggaagcag cgtgatttag 480
tcgcggatat tagtagtggg gatggtagga ccacaaacta tgcggacttc gcgaagggcc 540
gattcaccat ctccagagac aacatcaaga acacggtctt tctgcgaatg actaacctga 600
aacctgagga cacggccgct tactactgta acaccttctt ttcgtttctg gggattgcgc 660
gttcttgggg ccaggggacc caggtcactg tctcctcagc ggccgcagaa caaaaactca 720
tctcagaaga ggatctgaat ggggccgcat agactgttga aagttgttta gcaaaacctc 780
atacagaaaa ttcatttact aacgtctgga aagacgacaa aactttagat cgttacgcta 840
actatgaggg ctgtctgtgg aatgctacag gcgttgggt ttgtactggt gacgaaactc 900
agtgttacgg tacatgggtt cctattgggc ttgctatccc tgaaaatgag ggtggtggct 960

ES 2 735 981 T3

ctgaggggtgg cggttctgag ggtggcgggtt ctgaggggtgg cggactactaaa cctcctgagt 1020
 acggtgatac acctattccg ggctatactt atatcaaccc tctcgacggc acttatccgc 1080
 ctggtactga gcaaaaacccc gctaataccta atccttctct tgaggagtct cagcctctta 1140
 atactttcat gtttcagaat aataggttcc gaaataggca ggggtgcatta actgtttata 1200
 cgggcactgt tactcaaggc actgaccccg ttaaaactta ttaccagtac actcctgtat 1260
 catcaaaagc catgtatgac gcttactgga acggtaaatt cagagactgc gctttccatt 1320
 ctggtcttaa tgaggatcca ttcgtttgtg aatatcaagg ccaatcgtct gacctgcctc 1380
 aacctcctgt caatgctggc ggcggtctct gtgggtggtc tgggtggcggc tctgaggggtg 1440
 gcggctctga ggggtggcgggt tctgaggggtg gcggctctga ggggtggcgggt tccgggtggcg 1500
 gctccgggtc cgggtgatttt gattatgaaa aaatggcaaa cgctaataag ggggctatga 1560
 ccgaaaatgc cgatgaaaac gcgctacagt ctgacgctaa aggcaaaactt gattctgtcg 1620
 ctactgatta cgggtctgct atcgatgggt tcattggtga cgtttccggc cttgctaatag 1680
 gtaatggtgc tactggtgat tttgctggct ctaattccca aatggctcaa gtcggtgacg 1740
 gtgataattc acctttaatg aataatttcc gtcaatattt accttctttg cctcagtcgg 1800
 ttgaatgtcg cccttatgtc tttggcgtg gtaaacata tgaattttct attgattgtg 1860
 acaaaataaa cttattccgt ggtgtctttg cgtttctttt atatgttgcc acctttatgt 1920
 atgtattttc gacgtttgct aacatactgc gtaataagga gtcttaataa gaattcactg 1980
 gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccctact taatgcctt 2040
 gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac cgatgcctt 2100
 tcccacagct tgccgagcct gaatggcgaa tggcgctga tgcggatatt tctccttacg 2160
 catctgtgcg gtatttcaca ccgcatacgt caaagcaacc atagtacgcg ccctgtagcg 2220
 gcgcattaag cgcggcgggt gtgggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca cttgccagcg 2280
 ccctagcgc cgcctctttc gctttcttcc ctctctttct cgccacgttc gccggctttc 2340
 cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc 2400
 tcgaccccaa aaaacttgat ttgggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga 2460
 cggtttttcg ccctttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa 2520
 ctggaacaac actcaaccct atctcgggct attcttttga tttataaggg attttgccga 2580
 tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca 2640
 aatatataac gtttacaatt ttatggtgca ctctcagtac aatctgctct gatgccgcat 2700
 agttaagcca gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc gccctgacgg gcttgtctgc 2760
 tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg gagctgcatg tgtcagaggt 2820
 tttcacgctc atcacccgaaa cgcgcgagac gaaaggcct cgtgatacgc ctatttttat 2880

ES 2 735 981 T3

aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt cggggaaatg 2940
 tgcgcggaac ccctatttgt ttatTTTTct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga 3000
 gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac 3060
 atttccgtgt cgcccttatt ccctTTTTtg cggcattttg ccttctgtt tttgctcacc 3120
 cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggTgcacga gtgggttaca 3180
 tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc 3240
 caatgatgag cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg 3300
 ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac 3360
 cagtacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca 3420
 taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcggg ggaccgaagg 3480
 agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac 3540
 cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg 3600
 caacaacggt gcgcaaaact ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat 3660
 taatagactg gatggagcgc gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg 3720
 ctggctggtt tattgctgat aaatctggag cgggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg 3780
 cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc 3840
 aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc 3900
 attgtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 3960
 tttaatTTaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 4020
 aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 4080
 gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 4140
 cgggtggttg tttgccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca 4200
 gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca 4260
 agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg 4320
 ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataaagg 4380
 cgcagcggtc gggctgaacg gggggttctg gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct 4440
 acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 4500
 gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggTcggaac aggagagcgc acgagggagc 4560
 ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttgcacc ctctgacttg 4620
 agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg 4680
 cggccttttt acggttctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 4740
 tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 4800
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcggagg agcgggaag 4848

- 5 <210> 11
- <211> 6167
- <212> ADN
- <213> Artificial

ES 2 735 981 T3

<220>

<223> p1

<400> 11

ttgtttat	ttctaaatac	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	60
aatgcttcaa	taatattgaa	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	120
tattcccttt	tttgccgcat	tttgccttcc	tgtttttgct	caccagaaa	cgctggtgaa	180
agtaaaagat	gctgaagatc	agttgggtgc	acgagtgggt	tacatcgaac	tgatctcaa	240
cagcgtaag	atccttgaga	gttttcgccc	cgaagaacgt	tttccaatga	tgagcacttt	300
taaagttctg	ctatgtggcg	cggtattatc	ccgtgttgac	gccgggcaag	agcaactcgg	360
tcgccgcata	cactatttctc	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagca	420
tcttacggat	ggcatgacag	taagagaatt	atgcagtgct	gccataacca	tgagtgataa	480
cactgcggcc	aacttacttc	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	540
gcacaacatg	ggggatcatg	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	600
cataccaaac	gacgagcgtg	acaccacgat	gcctgtagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	660
actattaact	ggcgaactac	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	720
ggcggataaa	gttgcaggac	cacttctgcg	ctcggccctt	ccggctggct	ggtttattgc	780
tgataaatct	ggagccgggt	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	840
tggtaaagccc	tcccgtatcg	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	900
acgaaataga	cagatcgctg	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	960
ccaagtttac	tcatatatac	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	1020
ctaggtgaag	atcctttttg	ataatctcat	gaccaaaatc	ccttaacgtg	agttttcggt	1080
ccactgagcg	tcagaccccc	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	1140
gcgcgtaatc	tgtgtcttgc	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcgggtg	tttgtttgcc	1200
ggatcaagag	ctaccaactc	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	1260
aaatactgtc	cttctagtgt	agccgtagtt	aggccaccac	ttcaagaact	ctgtagcacc	1320
gcctacatac	ctcgtctctg	taatcctggt	accagtggct	gctgccagtg	gcgataagtc	1380
gtgtcttacc	gggttggaact	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	1440
aacgggggggt	tcgtgcacac	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	1500

ES 2 735 981 T3

cctacagcgt gagcattgag aaagcgcac gcttcccga gggagaaag cggacaggta 1560
tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttcag ggggaaacgc 1620
ctggtatcct tatagtcctg tcgggttctg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg 1680
atgctcgtca ggggggcgga gcctatgga aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1740
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1800
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cggccagacc gaacgaccga 1860
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggga agagcgcctg atgcggattt ttctccttac 1920
gcatctgtgc ggtatttcac accgcatata tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat 1980
gccgcatagt taagccagta tacaactccgc tatcgcctacg tgactgggtc atggctgcgc 2040
cccgcacacc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat 2160
caccgaaacg cgcgaggcag ctgcggtaaa gctcatcagc gtggtcgtga agcgattcac 2220
agatgtctgc ctgttcatcc gcgtccagct cgttgagttt ctccagaagc gttaatgtct 2280
ggcttctgat aaagcgggcc atgttaaggg cggttttttc ctgtttggtc acttgatgcc 2340
tccgtgtaag ggggaatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat 2400
gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccgggta ctggaacggt gtgagggtaa 2460
acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg 2520
cttcgttaat acagatgtag gtgtccaca gggtagccag cagcatcctg cgatgcagat 2580
ccggaacata atgggtgcag gcgctgactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa 2640
accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacggt ttgcagcagc agtcgcttca 2700
cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag 2760
ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcaccggt ggccaggacc caacgctgcc 2820
cgagatgcgc cgctgctggc tgctggagat ggcggacgcg atggatatgt tctgccaagg 2880
gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg gctccaattc ttggagtgg 2940
gaatccgtta gcgagggtgc gccggcttcc attcaggtcg aggtggcccg gctccatgca 3000
ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tataggcggc gcctacaat ccatgccaac 3060
ccgttccatg tgctcggcga ggcggcataa atcggcgtga cgatcagcgg tccagtgatc 3120
gaagttaggc tggtaaagc cgcgagcgat ccttgaagct gtcccctgat gtcgtcatct 3180
acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcatcccga tgccgcccga agcgagaaga 3240
atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtgcggaacg ccagcaagac gtagcccagc 3300
gcgtcggcca gcttgcaatt cgcgctaact tacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 3360

ES 2 735 981 T3

tttccagtgc ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 3420
 aggcggtttg cgtattgggc gccagggtgg tttttctttt caccagtgag acgggcaaca 3480
 gctgattgcc cttcaccgcc tggccctgag agagttgcag caagcgggcc acgctggttt 3540
 gccccagcag gcgaaaatcc tgtttgatgg tggttgacgg cgggatataa catgagctgt 3600
 cttcgggtatc gtcgtatccc actaccgaga tatccgcacc aacgcgcagc ccggactcgg 3660
 taatggcgcg cattgcgccc agcgccatct gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa 3720
 cgatgccctc attcagcatt tgcattggtt gttgaaaacc ggacatggca ctccagtgcg 3780
 cttcccgttc cgctatcggc tgaatttgat tgcgagtgag atatttatgc cagccagcca 3840
 gacgcagacg cgccgagaca gaacttaatg gtcccgctaa cagcgcgatt tgcctgatgac 3900
 ccaatgcgac cagatgctcc acgcccagtc gcgtaccgtc ttcattgggag aaaataatac 3960
 tgttgatggg tgtctggtca gagacatcaa gaaataacgc cggaacatta gtgcaggcag 4020
 cttccacagc aatggcatcc tggctcatcca gcggatagtt aatgatcagc ccaactgacgc 4080
 gttgcgagag aagattgtgc accgcccgtt tacaggcttc gacgcccgtt cgttctacca 4140
 tcgacaccac cacgctggca cccagttgat cggcgcgaga tttaatcgcc gcgacaattt 4200
 gcgacggcgc gtgcagggcc agactggagg tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc 4260
 ccgccagttg ttgtgccacg cggttgggaa tgtaattcag ctccgccatc gccgcttcca 4320
 ctttttcccg cgttttcgca gaaacgtggc tggcctggtt caccacgcgg gaaacggtct 4380
 gataagagac accggcatac tctgcgacat cgtataacgt tactggtttc acattcacca 4440
 ccctgaattg actctcttcc gggcgctatc atgccatacc gcgaaaggtt ttgcgccatt 4500
 cgatggtgtc aacgtaaatt catgccgctt cgccttcgag cgcgaattgc aagctgatcc 4560
 ggagcttata gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 4620
 tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 4680
 gttctggata atgttttttg cgcgcacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 4740
 gctgttgaca attaatcadc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 4800
 cacacaggaa acagaattcc atatgaaata cctattacca acagcagcag ctgggttatt 4860
 attgctcgtc gcgcagccgg ccatggccca ggtcaccgtc tcctcacgta cggtaggctgc 4920
 accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt 4980
 tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga agtggtgataa 5040
 cgcctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 5100
 ctacagcctc agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta 5160
 cgctcgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctccgccggtg acaaagagct tcaaccgcgg 5220
 agagtgtgca ggtgattaca aagacgatga cgataagtaa taaacaggaa acagaagtcc 5280

ES 2 735 981 T3

atatgaaata cctattgcct acggcagccg ctggattggtt attactcgcg gccagccgg 5340
 ccatggccgc tagcaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca 5400
 cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggcaagga ctacttcccc gaaccgggta 5460
 cgggtgcgtg gaactcagc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac 5520
 agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc agcttgggca 5580
 cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag 5640
 ttgagcccaa atcttgtgcg gccgcagaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaatg 5700
 gggccgtaca tcaccacat catcatggga gctaagcttc tgttttgcg gatgagagaa 5760
 gattttcagc ctgatacaga ttaaatacaga acgcagaagc ggtctgataa aacagaattt 5820
 gcctggcggc agtagcgcg tgggtcccacc tgaccccatg ccgaactcag aagtgaacg 5880
 ccgtagcgc gatggtagt tggggtctcc ccatgcgaga gtagggaact gccagcctc 5940
 aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg 6000
 tgaacgtct cctgagtag acaaatccgc cgggagcggga tttgaacgtt gcgaagcaac 6060
 ggccccgagg accctggcgg gcaggacgcc cgccataaac tgccaggcat caaattaagc 6120
 agaaggccat cctgacggat ggcctttttg cgtttctaca aactctt 6167

<210> 12
 <211> 7246
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> p514

10

<400> 12
 cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc 60
 gatggtgtca acgtaaatgc atgccgcttc gccttcgcgc gcgaattgca agctgatccg 120
 gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180
 ggtatggctg tgcaggtcgt aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgactcccg 240
 ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
 ctggtgacaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggga taacaatttc 360
 acacaggaaa cagaattcca tatgaaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
 ttgctcgcctg cgcagccggc catggccgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttc 480
 gtgcaggcgg gggaaatctct gacgctctcc tgtacaagtt ctacactgac cttcactccg 540
 tatcgcattg cctggtaccg ccaggctcca gggaagcagc gtgatttagt cgcggatatt 600
 agtagtggtg atggtaggac cacaaactat gcggacttcg cgaagggccg attcaccatc 660

ES 2 735 981 T3

tccagagaca acatcaagaa cacggtcttt ctgcgaatga ctaacctgaa acctgaggac 720
acggccgtct actactgtaa caccttcggt tcgtttggg ggattgcgcg ttcttggggc 780
caggggaccc aggtcaccgt ctctcacgt acggtggctg caccatctgt ctctcatctc 840
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgect gctgaataac 900
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 960
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 1020
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 1080
cagggcctga gctcgcgggt gacaaagagc ttcaaccgcg gagagtgtgc aggtgattac 1140
aaagcagatg acgataagta ataaacagga aacagaagtc catatgaaat acctattgcc 1200
tacggcagcc gctggattgt tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct 1260
gggtgagttc gggggagagt tgggtgcaggc tgggggctct ctgagactct cctgtgcagc 1320
ctctggcctc accttcagta gctataacat gggctggttc cgccgggctc caggggaagga 1380
gcgtgagttt gtagcatcta ttacctggag tggtcgggac acattctatg cagactccgt 1440
gaagggccga ttcacccatct ccagagacaa cgccaagaac actgtttatc tgcaaatgag 1500
cagcctgaaa cctgaggaca cggccgttta ttattgtgct gcaaaccctt ggccagtggc 1560
ggcgcaccgt agtggcacct actggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagctag 1620
caccaagggc ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac 1680
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa 1740
ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact 1800
ctactccctc agcagcgtag tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat 1860
ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc 1920
ttgtgcggcc gcagaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttcgtgc aggcggggga 1980
atctctgacg ctctcctgta caagttctac actgacctc actccgtatc gcatggcctg 2040
gtaccgccag gctccaggga agcagcgtga tttagtcgcg gatattagta gtggtgatgg 2100
taggaccaca aactatgagg acttcgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacat 2160
caagaacacg gtctttctgc gaatgactaa cctgaaacct gaggacacgg ccgtctacta 2220
ctgtaacacc ttcgtttcgt ttgtggggat tgccgcttct tggggccagg ggaccaggt 2280
cactgtctcc tcagcggccg cagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatggggc 2340
cgtacatcac caccatcatc atgggagcta agcttggctg ttttggcggg tgagagaaga 2400
ttttcagcct gatacagatt aatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa cagaatttgc 2460
ctggcggcag tagcgcgggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa gtgaaacgcc 2520
gtagcgcgca tggtagtgtg gggctctccc atgcgagagt agggaaactgc caggcatcaa 2580

ES 2 735 981 T3

ataaaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt ttatctggtt tttgtcggtg 2640
aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg 2700
cccggaggac cctggcgggc aggacgcccg ccataaactg ccaggcatca aattaagcag 2760
aaggccatcc tgacggatgg cctttttgcg tttctacaaa ctcttttgtt tatttttcta 2820
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataacct tgataaatgc ttcaataata 2880
ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc ccttttttgc 2940
ggcattttgc cttcctgttt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga 3000
agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct 3060
tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg 3120
tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta 3180
ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat 3240
gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt 3300
acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga 3360
tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga 3420
gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga 3480
actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc 3540
aggaccactt ctgcgctcgg cccttcgggc tggctggtt attgctgata aatctggagc 3600
cggtagcgtt gggctctcgg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg 3660
tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat 3720
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata 3780
tatactttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaa aggatctag tgaagatcct 3840
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga 3900
ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg 3960
cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc 4020
aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgagc ataccaaata ctgtccttct 4080
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc 4140
tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt 4200
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg 4260
cacacagccc agcttgagac gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca 4320
ttgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag 4380
ggtcggaaca ggagagcgca cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag 4440

ES 2 735 981 T3

tcctgtcggg tttcgcacc tctgacttga gcgtcgatth ttgtgatgct cgtcaggggg 4500
 gcgagccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg 4560
 gccttttgct cacatgttct ttcctgcggt atcccctgat tctgtggata accgtattac 4620
 cgcctttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt 4680
 gagcgaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtatthttctc cttacgcac c tgtgcggtat 4740
 ttcacaccgc atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 4800
 cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gggtcatggc tgcgccccga caccgccea 4860
 caccgcctga cgcgcctga cgggcttctc tgcctccggc atccgcttac agacaagctg 4920
 tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggtthttcacc gtcacaccg aaacgcgcga 4980
 ggcagctgcg gtaaagctca tcagcgtggt cgtgaagcga ttcacagatg tctgcctgtt 5040
 catccgcgct cagctcgttg agthttctca gaagcgttaa tgtctggctt ctgataaagc 5100
 gggccatgth aaggcgggtt thttctgth ttgtcacttg atgcctccgt gtaaggggga 5160
 atthctgthc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt 5220
 tactgatgat gaacatgcc ggthtactgga acgthtgtag ggtaaacaac tggcggatg 5280
 gatgcggcgg gaccagagaa aatcactca ggtcaatgc cagcgtctc ttaatacaga 5340
 tgtaggtgth ccacagggta gccagcagca tctgcgatg cagatccgga acataatggt 5400
 gcagggcgtg gacttccgcg thttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca 5460
 tgttgthgct caggtcgcag acgthttgca gcagcagtcg cttcacgthc gctcgcgth 5520
 cgggtattca thctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg thctcaacga 5580
 caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggaccacaac ctgcccgaga tgcgccgct 5640
 gcgctgctg gagatggcgg acgcgatgga tatgthctgc caagggthg thtgccatt 5700
 cacagthctc cgcaagaath gattgctcc aathcttggg tgggtgaatc cgttagcgag 5760
 gtgccgccg thttcattca ggtcgaggtg gcccgctcc atgcaccgcg acgcaacgcg 5820
 gggaggcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccgth ccatgtgctc 5880
 gccgaggcgg cataaathcg cgtgacgatc agcggthccag tgatcgaagt taggctgtha 5940
 agagccgcga gcgatccttg aagctgtccc tgatgthcgt catctacctg cctggacagc 6000
 atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaathc aatggggaag 6060
 gccatccagc ctgcgctgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgth gccagcttg 6120
 caathgcgc taactthcat taathgcgth gcgctcactg cccgctthcc agtcgggaaa 6180
 cctgtcgtgc cagctgcath aatgaathcg ccaacgcgcg gggagagcg gthtgctat 6240
 tgggcgccag ggtgththth thttthacca gtgagacggg caacagctga thgctthca 6300
 ccgctggcc ctgagagagth tgcagcaagc ggtccacgct gththgccc agcagggcaa 6360

ES 2 735 981 T3

aatcctgttt gatggtgggt gacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 6420
atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcgtaatg gcgcgcattg 6480
cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 6540
gcatttgcat ggtttgttga aaaccggaca tggcactcca gtcgccttcc cgttccgcta 6600
tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 6660
agacagaact taatgggtccc gctaacagcg cgatttgctg atgacccaat gcgaccagat 6720
gctccacgcc cagtgcgcta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 6780
ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 6840
catcctggtc atccagcggga tagttaatga tcagcccact gacgcgttgc gcgagaagat 6900
tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcgttc taccatcgac accaccacgc 6960
tggcaccag ttgatcggcg cgagatttaa tcgcccgac aatttgcgac ggcgcgtgca 7020
gggccagact ggaggtggca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 7080
ccacgcggtt gggaaatgta ttcagctccg ccatcgcgcg ttcactttt tcccgcgttt 7140
tcgcagaaac gtggctggcc tggttacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 7200
catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccac 7246

<210> 13
<211> 6877
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> p14

<400> 13
cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc 60
gatggtgtca acgtaaatgc atgccgcttc gccttcgccc gcgaattgca agctgatccc 120
gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180
ggtatggctg tgcaggtcgt aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgcactcccg 240
ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
ctggtgacaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggga taacaatttc 360
acacaggaaa cagaattcca tatgaaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
ttgctcgcctg cgcagccggc catggccgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttc 480
gtgcaggcgg gggaaatctct gacgctctcc tgtacaagtt ctacactgac cttcactccg 540
tatcgcattg cctggtaccg ccaggctcca gggaagcagc gtgatttagt cgcggatatt 600
agtagtggtg atggtaggac cacaaactat gcggacttcg cgaagggccg attcaccatc 660

ES 2 735 981 T3

tccagagaca acatcaagaa cacggtcttt ctgcgaatga ctaacctgaa acctgaggac 720
acggccgtct actactgtaa caccttcggt tcgtttggg ggattgcgcg ttcttggggc 780
caggggaccc aggtcaccgt ctctcacgt acggtggctg caccatctgt ctctcatctc 840
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgect gctgaataac 900
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 960
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 1020
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 1080
cagggcctga gctcgcgggt gacaaagagc ttcaaccgcg gagagtgtgc aggtgattac 1140
aaagacgatg acgataagta ataacagga aacagaagtc catatgaaat acctattgcc 1200
tacggcagcc gctggattgt tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct 1260
gggtgagttt gggggagagt tgggtgcaggc tgggggctct ctgagactct cctgtgcagc 1320
ctctggcctc accttcagta gctataacat gggctggttc cgccgggctc caggggaagga 1380
gcgtgagttt gtagcatcta ttacctggag tggtcgggac acattctatg cagactccgt 1440
gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaagaac actgtttatc tgcaaatgag 1500
cagcctgaaa cctgaggaca cggccgttta ttattgtgct gcaaaccctt gccagtgcc 1560
ggcgcaccgt agtggcacct actggggcca agggaccagc gtcaccgtct cctcagctag 1620
caccaagggc ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac 1680
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa 1740
ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcctacagt cctcaggact 1800
ctactccctc agcagcgtag tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat 1860
ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaadc 1920
ttgtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgtacatca 1980
ccaccatcat catgggagct aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 2040
tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 2100
gtagcgcggg ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcggcg 2160
atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaacga 2220
aaggetcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcggg gaacgctctc 2280
ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgaggga 2340
ccctggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 2400
ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct aaatacattc 2460
aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag 2520
gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgcccttatt cccttttttg cggcattttg 2580

ES 2 735 981 T3

ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 2640
 ggggtcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 2700
 tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt 2760
 attatcccgt gttgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa 2820
 tgacttggtt gagtactcac cagtccacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 2880
 agaattatgc agtgctgcc a taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac 2940
 aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac 3000
 tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 3060
 cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac 3120
 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 3180
 tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 3240
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt 3300
 tatctacacg acgggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 3360
 aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 3420
 gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa 3480
 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga 3540
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac 3600
 aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 3660
 tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 3720
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat 3780
 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag 3840
 acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 3900
 cagcttgagg cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag 3960
 cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac 4020
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 4080
 gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 4140
 atgaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 4200
 tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 4260
 gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga 4320
 agcgggaagag cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgaggta tttcacaccg 4380
 catatatggt gcaactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca 4440

ES 2 735 981 T3

ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acacccgctg 4500
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct 4560
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc 4620
ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt tcatccgctg 4680
ccagctcggt gagtttctcc agaagcgtta atgtctggct tctgataaag cgggccatgt 4740
taaggcggtt ttttctctgt ttggtcactt gatgcctccg tgtaaggggg aatttctggt 4800
catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga 4860
tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia ctggcggtat ggatgcggcg 4920
ggaccagaga aaaatcactc agggtaaatg ccagcgcctc gtaatacag atgtaggtgt 4980
tccacagggg agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc 5040
tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg aagaccattc atgttggtgc 5100
tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt cgctcgcgta tcggtgattc 5160
attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg gcctcaacg acaggagcac 5220
gatcatgcgc acccgtggcc aggacccaac gctgcccag atgcgccgcg tgcggctgct 5280
ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct 5340
ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg agtgggtgaat ccgttagcga ggtgccgccc 5400
gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag 5460
acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat gccaacccgt tccatgtgct cgcgaggcgc 5520
gcataaatcg ccgtgacgat cagcggcca gtgatcgaag ttaggctggg aagagccgcg 5580
agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggctg tcatctacct gcctggacag catggcctgc 5640
aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg agaagaatca taatggggaa ggccatccag 5700
cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag cccagcgcgt cggccagctt gcaattcgcg 5760
ctaacttaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa acctgtcgtg 5820
ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgcca 5880
gggtggtttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc 5940
cctgagagag ttgcagcaag cgggtccacgc tggtttccc cagcaggcga aaatcctggt 6000
tgatggtggt tgacggcggg atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatccacta 6060
ccgagatata cgcaccaacg cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcat gcgccagcg 6120
ccatctgatc gttggaacc agcatcgcag tgggaacgat gccctcattc agcatttga 6180
tggtttggtg aaaaccggac atggcactcc agtcgccttc ccgttccgct atcggctgaa 6240
tttgattgcg agtgagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac 6300
ttaatggtcc cgctaacagc gcgatttctg gatgacccaa tgcgaccaga tgetccacgc 6360

ES 2 735 981 T3

ccagtcgctg accgtcttca tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga 6420
 catcaagaaa taacgccgga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt 6480
 catccagcgg atagttaatg atcagcccac tgacgcggtg cgcgagaaga ttgtgcaccg 6540
 ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca 6600
 gttgatcggc gcgagattta atcgccgcga caatttgca cggcgcgtgc agggccagac 6660
 tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact gtttgccgc cagttgtgt gccacgcggt 6720
 tgggaatgta attcagctcc gccatgcgg cttccacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa 6780
 cgtggctggc ctggttcacc acgcgggaaa cggctctgata agagacaccg gcatactctg 6840
 cgacatcgta taacgttact ggtttcacat tcaccac 6877

<210> 14
 <211> 7237
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> p515

10

<400> 14
 cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataccg cgaaaggttt tgcgccattc 60
 gatggtgtca acgtaaatgc atgccgcttc gccttcgctc gcgaattgca agctgatccg 120
 gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180
 ggtatggctg tgcaggctctg aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgactcccg 240
 ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
 ctgttgaaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc 360
 acacaggaaa cagaattcca tatgaaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
 ttgctcgtc cgcagccggc catggccgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttc 480
 gtgcaggcgg gggaaatctct gacgctctcc tgtacaagtt ctacactgac cttcactccg 540
 tatcgcattg cctggtaccg ccaggctcca ggaagcagc gtgatttagt cgcggatatt 600
 agtagtggtg atggtaggac cacaaactat gcggacttcg cgaagggccg attcaccatc 660
 tccagagaca acatcaagaa cacggtcttt ctgcgaatga ctaacctgaa acctgaggac 720
 acggccgtct actactgtaa caccttcggt tcgtttggtg ggattgcgct ttcttggggc 780
 caggggacct aggtcaccgt ctctcactgc acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 840
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 900
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac 960
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 1020

ES 2 735 981 T3

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 1080
 cagggcctga gctcgcgggt gacaaagagc ttcaaccgcg gagagtgtgc aggtgattac 1140
 aaagacgatg acgataagta ataaacagga aacagaagtc catatgaaat acctattgcc 1200
 tacggcagcc gctggattgt tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct 1260
 ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggggagtct ctgacactct cctgtgtagt 1320
 tgctggaagc atcttcagct tcgccatgag ctggtatcgc caggctccag gaaaagagcg 1380
 cgaattggtc gcacgtattg gttcggatga tcgggtaacg tacgcagatt ccgtgaaggg 1440
 ccgatttacc atctccagag acaacatcaa gcgcacggcg ggctgcaga tgaacagcct 1500
 gaaacctgag gacacggccg tctactactg caatgcccaa acagatttga gggattggac 1560
 tgtgcgagag tactggggcc aggggaccca ggtcacccgc tcctcagcta gcaccaaggg 1620
 cccatcggtc ttccccctgg caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1680
 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1740
 cctgaccagc ggcgtgcaca ccttccccgc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct 1800
 cagcagcgta gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1860
 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaaat cttgtgcggc 1920
 cgcagaggtg cagctgggtg agtctggggg aggcctcgtg caggcggggg aatctctgac 1980
 gctctcctgt acaagtctta cactgacctt cactccgtat cgcattggcct ggtaccgcca 2040
 ggctccaggg aagcagcgtg atttagtcgc ggatattagt agtgggtgat gtaggaccac 2100
 aaactatgcg gacttcgcga agggccgatt caccatctcc agagacaaca tcaagaacac 2160
 ggtctttctg cgaatgacta acctgaaacc tgaggacacg gccgtctact actgtaacac 2220
 cttcgtttcg tttgtgggga ttgcccgttc ttggggccag gggaccacag tcaactgtctc 2280
 ctcagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgtacatca 2340
 ccaccatcat catgggagct aagcttggtt gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 2400
 tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 2460
 gtagcgcggg ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga agtgaaacgc cgtagcggcg 2520
 atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaacga 2580
 aaggctcagt cgaaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcggg gaacgctctc 2640
 ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgaggga 2700
 ccctggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 2760
 ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttttgt ttatttttct aaatacattc 2820
 aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag 2880
 gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttttg cggcattttg 2940

ES 2 735 981 T3

ccttcctggt tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 3000
 ggggtcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 3060
 tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcggt 3120
 attatcccgt gttgacgccc ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa 3180
 tgacttggtt gagtactcac cagtccacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 3240
 agaattatgc agtgctgcc a taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac 3300
 aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac 3360
 tcgccttgat cgttggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 3420
 cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac 3480
 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 3540
 tctgcgctcg gcccttccgg ctggctgggt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 3600
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggg aagccctccc gtatcgtagt 3660
 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 3720
 aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 3780
 gattgattta aaacttcatt tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa 3840
 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga 3900
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac 3960
 aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 4020
 tccgaaggt aactggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 4080
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat 4140
 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag 4200
 acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 4260
 cagcttgagg cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag 4320
 cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac 4380
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 4440
 gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 4500
 atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 4560
 tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 4620
 gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga 4680
 agcgggaagag cgctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgaggta tttcacaccg 4740
 catatatggt gcaactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtatata 4800

ES 2 735 981 T3

ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acacccgctg 4860
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct 4920
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc 4980
ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt tcatccgctg 5040
ccagctcggt gagtttctcc agaagcgtta atgtctggct tctgataaag cgggccatgt 5100
taaggcggtt ttttctctgt ttggtcactt gatgcctccg tgtaaggggg aatttctgtt 5160
catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga 5220
tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia ctggcggtat ggatgcggcg 5280
ggaccagaga aaaatcactc agggtaaatg ccagcgcctc gtaatacag atgtaggtgt 5340
tccacagggg agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc 5400
tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg aagaccattc atgttggtgc 5460
tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt cgctcgcgta tcggtgattc 5520
attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg gcctcaacg acaggagcac 5580
gatcatgcgc acccgtggcc aggacccaac gctgcccag atgcgccgcg tgcggctgct 5640
ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct 5700
ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg agtgggtgaat ccgttagcga ggtgccgccc 5760
gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag 5820
acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat gccaacccgt tccatgtgct cgcgaggcgc 5880
gcataaatcg ccgtgacgat cagcggcca gtgatcgaag ttaggctggg aagagccgcg 5940
agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggctg tcatctacct gcctggacag catggcctgc 6000
aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg agaagaatca taatggggaa ggccatccag 6060
cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag cccagcgcgt cggccagctt gcaattcgcg 6120
ctaacttaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgcttc cagtcgggaa acctgtcgtg 6180
ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggg ggtttgcgta ttgggcgcca 6240
gggtggtttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc 6300
cctgagagag ttgcagcaag cgggtccacgc tggtttccc cagcaggcga aaatcctgtt 6360
tgatggtggt tgacggcggg atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatccacta 6420
ccgagatata cgcaccaacg cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcat gcgccagcg 6480
ccatctgatc gttggaacc agcatcgcag tgggaacgat gccctcattc agcatttga 6540
tggtttggtg aaaaccggac atggcactcc agtcgccttc ccgttccgct atcggctgaa 6600
tttgattgcg agtgagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac 6660
ttaatggtcc cgctaacagc gcgatttctg gatgacccaa tgcgaccaga tgetccacgc 6720

ES 2 735 981 T3

ccagtcgctg accgtcttca tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga 6780
 catcaagaaa taacgccgga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt 6840
 catccagcgg atagttaatg atcagcccac tgacgcggtg cgcgagaaga ttgtgcaccg 6900
 ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca 6960
 gttgatcggc gcgagattta atcgccgcga caatttgca cggcgcgtgc agggccagac 7020
 tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact gtttgccgc cagttggtgt gccacgcggt 7080
 tgggaatgta attcagctcc gccatgcgg cttccacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa 7140
 cgtggctggc ctggttcacc acgcgggaaa cggctctgata agagacaccg gcatactctg 7200
 cgacatcgta taacgttact ggtttcacat tcaccac 7237

<210> 15
 <211> 6868
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> p15

10

<400> 15
 ttgtttatth ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata 60
 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt 120
 tattcccttt tttgoggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 180
 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 240
 cagcggtaag atccttgaga gttttcggcc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 300
 taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg 360
 tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 420
 tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa 480
 cactcgggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 540
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 600
 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa 660
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 720
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggccct cggctggct ggtttattgc 780
 tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 840
 tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 900
 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 960
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1020

ES 2 735 981 T3

ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt 1080
ccactgagcg tcagaccccc tagaaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1140
gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1200
ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 1260
aaatactgtc cttctagtgt agccgtagt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1320
gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc 1380
gtgtettacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1440
aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1500
cctacagcgt gagcattgag aaagcggccac gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta 1560
tccggtaaag ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1620
ctggtatcct tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gattttttgtg 1680
atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1740
cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt 1800
ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga 1860
gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcggg agagcgcctg atgcgggtatt ttctccttac 1920
gcatctgtgc ggtatttcac accgcatata tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat 1980
gccgcatagt taagccagta tacactccgc tatcgctacg tgactgggtc atggctgcgc 2040
cccacacccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat 2160
caccgaaacg cgcgaggcag ctgcggtaaa gctcatcagc gtggctcgtga agcgattcac 2220
agatgtctgc ctgttcatcc gcgtccagct cgttgagttt ctccagaagc gttaatgtct 2280
ggcttctgat aaagcgggcc atgttaaggg cggttttttc ctgtttggtc acttgatgcc 2340
tccgtgtaag ggggaatttc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat 2400
gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccgttga ctggaacggt gtgagggtaa 2460
acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg 2520
cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg cgatgcagat 2580
ccggaacata atggtgcagg gcgctgactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa 2640
accgaagacc attcatggtt ttgctcaggt cgcagacggt ttgcagcagc agtcgcttca 2700
cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag 2760
ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcaccggt ggccaggacc caacgctgcc 2820
cgagatgcgc cgcgtgcggc tgctggagat ggcggacgcg atggatatgt tctgccaaag 2880
gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg gctccaatc ttggagtgg 2940

ES 2 735 981 T3

gaatccgtta gcgaggtgcc gccggcttcc attcaggtcg aggtggcccg gtcctcatgca 3000
 ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tatagggcgg cgcctacaat ccatgccaac 3060
 ccgttccatg tgctcgccga ggcggcataa atcgccgtga cgatcagcgg tccagtgatc 3120
 gaagttaggc tggtaagagc cgcgagcgat ccttgaagct gtccctgatg gtcgtcatct 3180
 acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcatcccga tgccgccgga agcgagaaga 3240
 atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtcgcgaacg ccagcaagac gtagcccagc 3300
 gcgtcggcca gcttgcaatt cgcgctaact tacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 3360
 tttccagtgc gaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 3420
 aggcggtttg cgtattgggc gccaggggtg tttttctttt caccagtgag acgggcaaca 3480
 gctgattgcc cttcaccgcc tggccctgag agagttgcag caagcgggtc acgctggttt 3540
 gccccagcag gcgaaaatcc tgtttgatgg tggttgacgg cgggatataa catgagctgt 3600
 cttcggatgc gtcgtatccc actaccgaga tatccgcacc aacgcgcagc ccggactcgg 3660
 taatggcgcg cattgcgccc agcgcctatc gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa 3720
 cgatgccttc attcagcatt tgcatggttt gttgaaaacc ggacatggca ctccagtgcg 3780
 cttcccgctc cgctatcggc tgaatttgat tgccgagtgc atatttatgc cagccagcca 3840
 gacgcagacg cgcgagaca gaacttaatg gtcccgctaa cagcgcgatt tgctgatgac 3900
 ccaatgcgac cagatgctcc acgcccagtc gcgtaccgtc ttcattggag aaaataatac 3960
 tgttgatggg tgtctggtca gagacatcaa gaaataacgc cggaaacatta gtgcaggcag 4020
 cttccacagc aatggcatcc tggtcaccca gcggatagtt aatgatcagc ccaactgacgc 4080
 gttgcgcgag aagattgtgc accgcgcgctt tacaggcttc gacgcgcgctt cgttctacca 4140
 tcgacaccac cacgctggca cccagttgat cggcgcgaga tttaatcgcc gcgacaattt 4200
 gcgacggcgc gtgcagggcc agactggagg tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc 4260
 ccgccagttg ttgtgccacg cggttgggaa tgtaattcag ctccgccatc gccgcttcca 4320
 ctttttcccg cgttttcgca gaaacgtggc tggcctggtt caccacgcgg gaaacgtct 4380
 gataagagac accggcatac tctgcgacat cgtataacgt tactggtttc acattacca 4440
 ccctgaattg actctcttcc gggcgctatc atgccatacc gcgaaagggt ttgcgccatt 4500
 cgatggtgtc aacgtaaatg catgccgctt cgccttcgcg cgcgaattgc aagctgatcc 4560
 ggagcttata gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 4620
 tggtatggct gtgcaggtcg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcactccc 4680
 gttctggata atgttttttg ccccagatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 4740
 gctgttgaca attaatcatc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 4800

ES 2 735 981 T3

cacacaggaa acagaattcc atatgaata cctattacca acagcagcag ctgggttatt 4860
attgctcgct gcgcagccgg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg ggggaggctt 4920
cgtgcaggcg ggggaatctc tgacgctctc ctgtacaagt tctacactga ccttcaactcc 4980
gtatcgcatg gcctggtacc gccaggctcc agggaagcag cgtgatttag tcgcgatat 5040
tagtagtggg gatggtagga ccacaaacta tgccgacttc gcgaaggcc gattcaccat 5100
ctccagagac aacatcaaga acacggtctt tctgccaatg actaacctga aacctgagga 5160
cacggccgct tactactgta acacettcgt ttcgtttgtg gggattgcgc gttcttgggg 5220
ccaggggacc caggtcaccg tctcctcacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt 5280
cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa 5340
cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa 5400
ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac 5460
cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctcgc aagtcacca 5520
tcagggcctg agctcgccgg tgacaaaagag cttcaaccgc ggagagtgtg caggtgatta 5580
caaagacgat gacgataagt aataaacagg aaacagaagt ccatatgaaa tacctattgc 5640
ctacggcagc cgctggattg ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gaggtgcagc 5700
tggtggagtc tgggggagggc ttagtgcagc ctggggagtc tctgacactc tcctgtgtag 5760
ttgctggaag catcttcagc ttcgccatga gctggtatcg ccaggctcca ggaaaagagc 5820
gcgaattggt cgcacgtatt ggttcggatg atcgggtaac gtacgcagat tccgtgaagg 5880
gccgatttac catctccaga gacaacatca agcgcacggc gggcctgcag atgaacagcc 5940
tgaaaacctga ggacacggcc gtctactact gcaatgccc aacagatttg agggattgga 6000
ctgtgcgaga gtactggggc caggggaccc aggtcacctg ctctcagct agcaccaagg 6060
gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc 6120
tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg 6180
ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc 6240
tcagcagcgt agtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 6300
tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa tcttgtgcgg 6360
ccgcagaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatgg ggccgtacat caccaccatc 6420
atcatgggag ctaagcttg ctgttttggc ggatgagaga agatcttcag cctgatacag 6480
attaatcag aacgcagaag cggctctgata aaacagaatt tgcttggcgg cagtagcgcg 6540
gtggtcccac ctgaccccat gccgaactca gaagtgaac gccgtagcgc cgtggttagt 6600
gtggggtctc cccatgcgag agtagggaac tgccaggcat caaataaac gaaaggctca 6660
gtcgaagac tgggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag 6720
gacaaatccg ccgggagcgg atttgaacgt tgccaagcaa cggcccggag gaccctggcg 6780
ggcaggacgc ccgccataaa ctgccaggca tcaaatag cagaaggcca tcctgacgga 6840
tggccttttt gcgtttctac aaactctt 6868

- 5 <210> 16
- <211> 6536
- <212> ADN
- <213> Artificial

ES 2 735 981 T3

<220>
<223> p1201

5 <400> 16
 ttgtttatth ttctaaatac attcaaatat gtatcogctc atgagacaat aaccctgata 60
 aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcct 120
 tattcccttt tttgoggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa cgctggtgaa 180
 agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa 240
 cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt 300
 taaagttctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac gccgggcaag agcaactcgg 360
 tcgccgata cactatttctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca 420
 tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtataa 480
 cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt 540
 gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc 600
 cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa 660
 actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga 720
 ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct ggtttattgc 780
 tgataaatct ggagccgggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga 840
 tggtaaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga 900
 acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga 960
 ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat 1020
 ctagtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaatac ccttaacgtg agttttogtt 1080
 ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct 1140
 gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc 1200
 ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc 1260
 aaatactgct cttctagtgat agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc 1320
 gcctacatac ctgctctgct taatcctggt accagtggtc gctgccagtg gcgataagtc 1380

ES 2 735 981 T3

gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg 1440
 aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata 1500
 cctacagcgt gagcattgag aaagcgcacc gcttcccga gggagaaagg cggacaggta 1560
 tccgtaagc ggcagggctg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc 1620
 ctggtatctt tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg 1680
 atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt 1740
 cctggccttt tgetggcctt ttgetcacat gttcttctct gcgttatccc ctgattctgt 1800
 ggataaacgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga 1860
 gcgcagcggag tcagtgagcg aggaagcggg agagcgcctg atgcggattt ttctccttac 1920
 gcatctgtgc ggtatttcac accgcatata tggtgcactc tcagtacaat ctgctctgat 1980
 gccgcatagt taagccagta tacactccgc tatcgtctag tgactgggtc atggctgcgc 2040
 cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg 2100
 cttacagaca agctgtgacc gtctccggga gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat 2160
 caccgaaacg cgcgaggcag ctgCGTaaa gctcatcagc gtggctcgtga agcgattcac 2220
 agatgtctgc ctgttcatcc gcgtccagct cgttgagttt ctccagaagc gttaatgtct 2280
 ggcttctgat aaagcgggcc atgttaaggg cggTTTTtct ctgTTTggtc acttgatgcc 2340
 tccgtgtaag ggggaaattc tgttcatggg ggtaatgata ccgatgaaac gagagaggat 2400
 gctcacgata cgggttactg atgatgaaca tgcccggtta ctggaacgtt gtgagggtaa 2460
 acaactggcg gtatggatgc ggcgggacca gagaaaaatc actcagggtc aatgccagcg 2520
 cttcgttaat acagatgtag gtgttccaca gggtagccag cagcatcctg cgatgcagat 2580
 ccggaacata atgggtcagg gcgctgactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa 2640
 accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacggt ttgcagcagc agtcgcttca 2700
 cgttcgctcg cgtatcggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag 2760
 ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcaccggt ggccaggacc caacgctgcc 2820
 cgagatgcgc cgcgtgcggc tgctggagat ggcggacgcg atggatatgt tctgccaagg 2880
 gttggtttgc gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg gctccaattc ttggagtgg 2940
 gaatcggta gcgaggtgcc gccggettcc attcaggtcg aggtggcccg gctccatgca 3000
 ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tataggcggg cgcctacaat ccatgccaac 3060
 ccgttccatg tgctcgccga ggcggcataa atcgccgtga cgatcagcgg tccagtgatc 3120
 gaagttaggc tggtaaagac cgcgagcgat ccttgaagct gtccctgatg gtcgtcatct 3180
 acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcattcccga tgccgcccga agcgagaaga 3240
 atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtgcggaacg ccagcaagac gtagcccagc 3300

ES 2 735 981 T3

gcgctcggcca gcttgcaatt cgcgctaact tacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 3360
 tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 3420
 aggcggtttg cgtattgggc gccaggggtg tttttctttt caccagtgag acgggcaaca 3480
 gctgattgcc cttcaccgcc tggcctgag agagttgcag caagcgggcc acgctggttt 3540
 gccccagcag gcgaaaatcc tgtttgatgg tggttgacgg cgggatataa catgagctgt 3600
 cttcggatcc gtgcgatccc actaccgaga tatccgcacc aacgcgcagc cgggactcgg 3660
 taatggcgcg cattgcgccc agcgcacatc gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa 3720
 cgatgcacctc attcagcatt tgcatggttt gttgaaaacc ggacatggca ctccagtcgc 3780
 cttcccgttc cgctatcggc tgaatttgat tgcgagtgag atatttatgc cagccagcca 3840
 gacgcagacg cgcgagaca gaacttaatg gtcccgttaa cagcgcgatt tgctgatgac 3900
 ccaatgcgac cagatgctcc acgcccagtc gcgtaccgtc ttcattgggag aaaataatac 3960
 tgttgatggg tgtctgtgca gagacatcaa gaaataacgc cggaaacatta gtgcaggcag 4020
 cttccacagc aatggcatcc tggcatcca gcggatagtt aatgatcagc ccaactgacgc 4080
 gttgcgcgag aagattgtgc accgcgcgct tacaggcttc gacgcgcgct cgttctacca 4140
 tcgacaccac cacgctggca cccagttgat cggcgcgaga ttaaatcgcc gcgacaattt 4200
 gcgacggcgc gtgcagggcc agactggagg tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc 4260
 ccgccagttg ttgtgccacg cggttgggaa tgtaattcag ctccgccatc gccgctcca 4320
 ctttttcccg cgttttcgca gaaacgtggc tggcctgggt caccacgcgg gaaacggtct 4380
 gataagagac accggcatac tctgcgacat cgtataacgt tactggtttc acattcacca 4440
 ccctgaattg actctcttcc gggcgtatc atgccatacc gcgaaagggt ttgcgccatt 4500
 cgatggtgtc aacgtaaatg catgcgcgct cgccttcgcg cgcgaattgc aagctgatcc 4560
 ggagcttacc gactgcacgg tgcaccaatg cttctggcgt caggcagcca tcggaagctg 4620
 tggtatggct gtgcaggctg taaatcactg cataattcgt gtcgctcaag gcgcaactcc 4680
 gttctggata atgttttttg cgcgcacatc ataacggttc tggcaaatat tctgaaatga 4740
 gctgttgaca attaatcacc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt 4800
 cacacaggaa acagaattcc atatgaaata cctattacca acagcagcag ctgggttatt 4860
 attgctcgtc gcgcagccgg ccatggccca ggtcaccgtc tcctcacgta cgggtggctgc 4920
 accatctgtc ttcactctcc cgcacatcga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt 4980
 tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa 5040
 cgcctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac 5100
 ctacagcctc agcagcacc tgcgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta 5160

ES 2 735 981 T3

cgccctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgcggtg acaaagagct tcaaccgcgg 5220
 agagtgtgca ggtgattaca aagacgatga cgataagtaa taaacaggaa acagaagtcc 5280
 atatgaata cctattgcct acggcagccg ctggattggtt attactcgcg gcccagccgg 5340
 ccatggccgc tagcaccaag ggcccatcgg tcttcccctt ggcaccctcc tccaagagca 5400
 cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga 5460
 cgggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcgvcgtgca caccttcccc gctgtcctac 5520
 agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc agcttgggca 5580
 cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag 5640
 ttgagcccaa atcttgtgac aaaactgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttcg 5700
 tgcaggcggg ggaatctctg acgctctcct gtacaagttc tacactgacc ttactccgt 5760
 atcgcacggc ctgggtaccg caggctccag ggaagcagcg tgatttagtc gcggatatta 5820
 gtagtgggta tggtaggacc acaaactatg cggacttcgc gaagggccga ttcaccatct 5880
 ccagagacaa catcaagaac acggctcttc tgcgaatgac taacctgaaa cctgaggaca 5940
 cggccgtcta ctactgtaac accttcgttt cgtttgtggg gattgcgcgt tcttggggcc 6000
 aggggaccca ggtcactgtc tcctcagcgg ccgcagaaca aaaactcatc tcagaagagg 6060
 atctgaatgg ggccgtacat caccaccatc atcatgggag ctaagcttct gttttggcgg 6120
 atgagagaag attttcagcc tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa 6180
 acagaatttg cctggcggca gtagcgcggt ggtcccacct gaccccatgc cgaactcaga 6240
 agtgaaacgc cgtagcgcgg atggtagtgt ggggtctccc catgvcgagag tagggaactg 6300
 ccaggcatca aataaaacga aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctggt 6360
 gtttgcggt gaacgctctc ctgagttaga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg 6420
 cgaagcaacg gcccgaggga ccctggcggg caggacgcc gccataaact gccaggcatc 6480
 aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actctt 6536

<210> 17
 <211> 7246
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> p1214

10

<400> 17
 cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataaccg cgaaaggttt tgcgccattc 60
 gatggtgtca acgtaaattg atgccgcttc gccttcgcgc gcgaattgca agctgatccg 120
 gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180
 ggtatggctg tgcaggctcg aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgcactcccc 240

ES 2 735 981 T3

ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
 ctgttgacaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc 360
 acacaggaaa cagaattcca tatgaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
 ttgctcgcctg cgcagccggc catggccgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttc 480
 gtgcaggcgg ggaatctct gacgctctcc tgtacaagtt ctacactgac cttcactccg 540
 tatcgcattg cctggtaccg ccaggctcca ggaagcagc gtgatttagt cgcggatatt 600
 agtagtggg atggttaggac cacaactat gcggacttcg cgaagggccg attcaccatc 660
 tccagagaca acatcaagaa cacggtcttt ctgcgaatga ctaacctgaa acctgaggac 720
 acggccgtct actactgtaa caccttcggt tcgtttgggg ggattgcccg ttcttggggc 780
 caggggacc aggtcaccgt ctctcacgt acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc 840
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 900
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggtaac 960
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 1020
 ctgacgcctg gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 1080
 cagggcctga gctcgcgggt gacaagagc ttcaaccgag gagagtgtgc aggtgattac 1140
 aaagacgatg acgataagta ataacagga aacagaagtc catatgaaat acctattgcc 1200
 tacggcagcc gctggattgt tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct 1260
 ggtggagtct gggggagagt tgggtcaggc tgggggctct ctgagactct cctgtgcagc 1320
 ctctggcctc accttcagta gctataacat gggctggttc cgcggggctc caggggaagga 1380
 gcgtgagttt gtagcatcta ttacctggag tggctgggac acattctatg cagactccgt 1440
 gaaggccga ttcacatct ccagagacaa cgccaagaac actgtttatc tgcaaatgag 1500
 cagcctgaaa cctgaggaca cggccgttta ttattgtgct gcaaaccctt ggccagtggc 1560
 ggcgccacgt agtggcacct actggggcca agggaccag gtcaccgtct cctcagctag 1620
 caccaagggc ccatcgtct tcccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac 1680
 agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcctggaa 1740
 ctcaggcgc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact 1800
 ctactccctc agcagcgtag tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacc agacctacat 1860
 ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc 1920
 ttgtgacaaa actgaggtgc agctgggtgga gtctggggga ggcttcgtgc aggcggggga 1980
 atctctgacg ctctcctgta caagttctac actgacctc actccgtatc gcatggcctg 2040
 gtaccgccag gctccagga agcagcgtga tttagtcgag gatattagta gtggtgatgg 2100

ES 2 735 981 T3

taggaccaca aactatgctg acttcgctgaa gggccgattc accatctcca gagacaacat 2160
 caagaacacg gtctttctgc gaatgactaa cctgaaacct gaggacacgg ccgtctacta 2220
 ctgtaaacacc ttcgtttctg ttgtggggat tgcgcgttct tggggccagg ggaccacagt 2280
 cactgtctcc tcagcggccg cagaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatggggc 2340
 cgtacatcac caccatcatc atgggagcta agcttggtctg ttttggcggg tgagagaaga 2400
 ttttcagcct gatacagatt aaatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa cagaatttgc 2460
 ctggcggcag tagcgcgggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa gtgaaacgcc 2520
 gttagcgcga tggtagtggtg gggctctccc atgctgaggt agggaaactgc caggcatcaa 2580
 ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttctgt ttatctgttg tttgtcggtg 2640
 aacgctctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc gaagcaacgg 2700
 cccggaggac cctggcgggc aggaccccc ccataaactg ccaggcatca aattaagcag 2760
 aaggccatcc tgacgatgg cctttttgctg tttctacaaa ctcttttgtt tatttttcta 2820
 aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataacct tgataaatgc ttcaataata 2880
 ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgct gcccttattc ccttttttgc 2940
 ggcattttgc cttcctggtt ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga 3000
 agatcagttg ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct 3060
 tgagagtttt cgccccgaag aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg 3120
 tggcgcggta ttatcccgtg ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta 3180
 ttctcagaat gacttggttg agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat 3240
 gacagtaaga gaattatgca gtgctgccat aaccatgagt gataaactg cggccaactt 3300
 acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga 3360
 tcatgtaact cgccttgatc gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga 3420
 gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgttg cgcaaaactat taactggcga 3480
 actacttact cttagctccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgtc 3540
 aggaccactt ctgcgctcgg cccttcggc tggctggttt attgctgata aatctggagc 3600
 cggtagcgt gggctctcgc gtatcattgc agcactgggg ccagatggtg agccctcccg 3660
 tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat 3720
 cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata 3780
 tatactttag attgatataa aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct 3840
 ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcggttccact gagcgtcaga 3900
 ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg 3960
 cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc 4020

ES 2 735 981 T3

aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgag ataccaaata ctgtccttct 4080
agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc 4140
tctgctaata ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccggggt 4200
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg 4260
cacacagccc agcttgagc gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca 4320
ttgagaaagc gccacgctc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag 4380
ggtcggaaca ggagagcgca cgaggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag 4440
tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg 4500
gcgagaccta tggaaaaacg ccagcaacgc ggcttttta cggttcctgg ccttttgctg 4560
gccttttgct cacatgttct tctcgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac 4620
cgcctttgag tgagctgata ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt 4680
gagcggaggaa gcggaagagc gcctgatgcg gtatcttctc cttacgcatc tgtgcggtat 4740
ttcacaccgc atatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 4800
cagtatacac tccgctatcg ctacgtgact gggctatggc tgcgccccga caccgccea 4860
caccgcctga cgcgccctga cgggcttgct tgctcccggc atccgcttac agacaagctg 4920
tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg aaacgcgca 4980
ggcagctgcg gtaaagctca tcagcgtggt cgtgaagcga ttcacagatg tctgcctggt 5040
catccgcgtc cagctcgttg agtttctcca gaagcgttaa tgtctggctt ctgataaagc 5100
gggccatggt aagggcggtt ttttctggt tggctcactg atgcctccgt gtaaggggga 5160
atctctgttc atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt 5220
tactgatgat gaacatgccc ggttactgga acgttgtgag ggtaaaacaac tggcggtatg 5280
gatgcggcgg gaccagagaa aatcactca gggccaatgc cagcgttcg ttaatacaga 5340
tgtaggtggt ccacagggta gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt 5400
gcaggcgcgt gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca 5460
tgttgtgct caggctcgag acgttttgca gcagcagctg cttcacgctc gctcgcgtat 5520
cggtgattca ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga 5580
caggagcacg atcatgcgca cccgtggcca ggacccaacg ctgcccgaga tgcgccgcgt 5640
gcggtcgtg gagatggcgg acgcgatgga tatgttctgc caagggttgg tttgcgcatt 5700
cacagttctc cgcaagaatt gattggctcc aattcttga gtggtgaatc cgtagcgag 5760
gtgccgcgg cttccattca ggtcgaggtg gccggctcc atgcaccgcg acgcaacgcg 5820
gggagcaga caaggtatag ggcggcgcct acaatccatg ccaaccggt ccatgtgctc 5880

ES 2 735 981 T3

gccgaggcgg cataaatcgc cgtgacgac agcgggccag tgatcgaagt taggctggta 5940
 agagcccgca gcgacccctg aagctgtccc tgatggctcg catctacctg cctggacagc 6000
 atggcctgca acgcgggcat cccgatgccg ccggaagcga gaagaatcat aatggggaag 6060
 gccatccagc ctgcgctcgc gaacgccagc aagacgtagc ccagcgcgtc ggccagcttg 6120
 caattcgcgc taacttacat taattgcggt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 6180
 cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 6240
 tgggcgccag ggtgggtttt cttttcacca gtgagacggg caacagctga ttgcccttca 6300
 ccgcctggcc ctgagagagt tgcagcaagc ggtccacgct ggtttgcccc agcaggcgaa 6360
 aatcctgttt gatggtggtt gacggcggga tataacatga gctgtcttcg gtatcgtcgt 6420
 atcccactac cgagatatcc gcaccaacgc gcagcccgga ctcggtaatg gcgcgcattg 6480
 cgcccagcgc catctgatcg ttggcaacca gcatcgcagt gggaacgatg ccctcattca 6540
 gcatttgcatt gttttgttga aaaccggaca tggcaactca gtgccttcc cgttccgcta 6600
 tcggctgaat ttgattgcga gtgagatatt tatgccagcc agccagacgc agacgcgccg 6660
 agacagaact taatggctcc gctaacagcg cgatttgctg atgaccaat gcgaccagat 6720
 gctccacgcc cagtcgcgta ccgtcttcat gggagaaaat aatactgttg atgggtgtct 6780
 ggtcagagac atcaagaaat aacgccggaa cattagtgca ggcagcttcc acagcaatgg 6840
 catcctggtc atccagcgga tagttaatga tcagccact gacgcggtgc gcgagaagat 6900
 tgtgcaccgc cgctttacag gcttcgacgc cgcttcttc taccatcgac accaccacgc 6960
 tggcaccagc ttgatcggcg cgagatttaa tcgccgcgac aatttgcgac ggcgcgctgca 7020
 gggccagact ggagggtgca acgccaatca gcaacgactg tttgcccgcc agttgttgtg 7080
 ccacgcggtt gggaaatgaa ttcagctccg ccacgcgcgc ttccactttt tcccgcgttt 7140
 tcgcagaaac gtggctggcc tggttcacca cgcgggaaac ggtctgataa gagacaccgg 7200
 catactctgc gacatcgtat aacgttactg gtttcacatt caccac 7246

<210> 18
 <211> 7237
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> p1215

10

<400> 18
 cctgaattga ctctcttccg ggcgctatca tgccataaccg cgaaaggttt tgccgcatcc 60
 gatggtgtca acgtaaattg atgccgcttc gccttcgagc gcgaattgca agctgatccg 120
 gagcttatcg actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt 180
 ggtatggctg tgcaggctcg aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgcactcccc 240

ES 2 735 981 T3

ttctggataa tgttttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag 300
 ctgttgacaa ttaatcatcg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc 360
 acacaggaaa cagaattcca tatgaatac ctattaccaa cagcagcagc tgggttatta 420
 ttgctcgctg cgcagccggc catggccgag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttc 480
 gtgcaggcgg ggaatctct gacgctctcc tgtacaagtt ctacactgac cttcactccg 540
 tatcgcatgg cctggtaccg ccaggctcca ggaagcagc gtgatttagt cgcgcatatt 600
 agtagtggg agtgtaggac cacaactat gcggacttcg cgaagggccg attcaccatc 660
 tccagagaca acatcaagaa cacggtcttt ctgcgaatga ctaacctgaa acctgaggac 720
 acggccgtct actactgtaa caccttcggt tcgtttgtgg ggattgcgcg ttcttggggc 780
 caggggacc aggtcaccgt ctctcacgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc 840
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 900
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac 960
 tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 1020
 ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 1080
 cagggcctga gctcgccggt gacaagagc ttcaaccgag gagagtgtgc aggtgattac 1140
 aaagacgatg acgataagta ataacagga aacagaagtc catatgaaat acctattgcc 1200
 tacggcagcc gctggattgt tattactcgc ggcccagccg gccatggccg aggtgcagct 1260
 ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggggagtct ctgacactct cctgtgtagt 1320
 tgctggaagc atcttcagct tcgccatgag ctggtatcgc caggctccag gaaaagagcg 1380
 cgaattggtc gcacgtattg gttcggatga tcgggtaacg tacgcagatt ccgtgaaggg 1440
 ccgatttacc atctccagag acaacatcaa gcgcacggcg ggcctgcaga tgaacagcct 1500
 gaaacctgag gacacggccg tctactactg caatgcccaa acagatttga gggattggac 1560
 tgtgcgagag tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc tcctcagcta gcaccaaggg 1620
 cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct 1680
 gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 1740
 cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactcct 1800
 cagcagcgta gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt 1860
 gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt gagcccaat cttgtgacaa 1920
 aactgaggtg cagctggtgg agtctggggg aggcttcgtg caggcggggg aatctctgac 1980
 gctctcctgt acaagttcta cactgacctt cactccgtat cgcattggcct ggtaccgcca 2040
 ggctccaggg aagcagcgtg atttagtcgc ggatattagt agtgggtgat gtaggaccac 2100

ES 2 735 981 T3

aaactatgcg gacttcgCGa agggccgatt caccatctcc agagacaaca tcaagaacac 2160
 ggtctttctg cgaatgacta acctgaaacc tgaggacacg gccgtctact actgtaacac 2220
 cttcgtttcg tttgtgggga ttgcgcgttc ttggggccag gggaccagcgc tcaactgtctc 2280
 ctcagcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgtacatca 2340
 ccaccatcat catgggagct aagcttggct gttttggcgg atgagagaag attttcagcc 2400
 tgatacagat taaatcagaa cgcagaagcg gtctgataaa acagaatttg cctggcggca 2460
 gttagcgggt ggtccacact gaccccatgc cgaactcaga agtgaacgc cgtagcgcgc 2520
 atggtagtgt ggggtctccc catgcgagag tagggaactg ccaggcatca aataaacga 2580
 aaggctcagt cgaaagactg ggcctttcgt tttatctgtt gtttgcgggt gaacgctctc 2640
 ctgagtagga caaatccgcc gggagcggat ttgaacgttg cgaagcaacg gcccgaggga 2700
 ccctggcggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc 2760
 ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcctttgt ttatttttct aaatacattc 2820
 aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag 2880
 gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt cgccttatt cccttttttg cggcattttg 2940
 ccttcctgtt tttgctcacc cagaaaagct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt 3000
 ggggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt 3060
 tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gttctgctat gtggcgcgggt 3120
 attatcccgt gttgacgccc ggcaagagca actcggctgc cgcatacact attctcagaa 3180
 tgacttggtt gagtactcac cagtacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag 3240
 agaattatgc agtctgcca taaccatgag tgataaacct gcggccaact tacttctgac 3300
 aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac 3360
 tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac 3420
 cacgatgcct gtagcaatgg caacaacggt gcgcaaaacta ttaactggcg aactacttac 3480
 tctagcttcc cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact 3540
 tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg 3600
 tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt 3660
 tatctacacg acggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat 3720
 aggtgcctca ctgattaagc attgtaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta 3780
 gattgattta aaacttcatt tttaattdaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa 3840
 tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga 3900
 aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac 3960
 aaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 4020

ES 2 735 981 T3

tccgaagta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc 4080
gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 4140
cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgtg cttaccgggt tggactcaag 4200
acgatagtta ccgataaagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 4260
cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag 4320
cgccacgctt cccgaagga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggcggaac 4380
aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 4440
gtttcggcac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct 4500
atgaaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttgc 4560
tcacatgttc tttcctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga 4620
gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcaggtcag tgagcgagga 4680
agcggagagc cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta tttcacaccg 4740
catatatggt gcaactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagtataca 4800
ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg acacccgcca acaccgctg 4860
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct 4920
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg aggcagctgc 4980
ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt tcatccgcgt 5040
ccagctcgtt gagtttctcc agaagcgta atgtctggct tctgataaag cgggccatgt 5100
taaggcgggt tttttcctgt ttggtcactt gatgcctccg tgtaaggggg aatttctggt 5160
catgggggta atgataccga tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga 5220
tgaacatgcc cggttactgg aacgttgtga gggtaaacia ctggcgggat ggtgctggcg 5280
ggaccagaga aaaatcactc aggttcaatg ccagcgcctc gtttaatacag atgtaggtgt 5340
tccacagggg agccagcagc atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc 5400
tgacttccgc gtttccagac tttacgaaac acggaaaccg aagaccattc atgttgttgc 5460
tcaggtcgca gacgttttgc agcagcagtc gcttcacggt cgctcgcgta tcggtgattc 5520
attctgctaa ccagtaaggc aaccccgcca gcctagccgg gtcctcaacg acaggagcac 5580
gatcatgcgc acccgtggcc aggacccaac gctgcccgag atgcgccgcg tgcggctgct 5640
ggagatggcg gacgcgatgg atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct 5700
ccgcaagaat tgattggctc caattcttgg agtgggtaac ccgttagcga ggtgccgccg 5760
gcttccattc aggtcgaggt ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggagggcag 5820
acaaggtata gggcggcgcc tacaatccat gccaacccgt tccatgtgct cgccgagggc 5880

ES 2 735 981 T3

gcataaatcg ccgtgacgat cagcgggtcca gtgatogaag ttaggctggt aagagccgcg 5940
 agcgatcctt gaagctgtcc ctgatggtcg tcatctacct gcctggacag catggcctgc 6000
 aacgcgggca tcccgatgcc gccggaagcg agaagaatca taatggggaa ggccatccag 6060
 cctcgcgtcg cgaacgccag caagacgtag cccagcgcgt cggccagctt gcaattcgcg 6120
 ctaacttaca ttaattgctg tgcgctcact gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg 6180
 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagagggc ggtttgcgta ttgggcgcca 6240
 ggggtggtttt tcttttcacc agtgagacgg gcaacagctg attgcccttc accgcctggc 6300
 cctgagagag ttgcagcaag cgggtccacgc tggtttgccc cagcaggcga aatcctggt 6360
 tgatggtggt tgacggcggg atataacatg agctgtcttc ggtatcgtcg tatcccacta 6420
 ccgagatata cgcaccaacg cgcagcccgg actcggtaat ggcgcgcatc gcgcccagcg 6480
 ccatctgata gttggcaacc agcatcgcag tgggaacgat gccctcattc agcatttgca 6540
 tggtttggtg aaaaccggac atggcactcc agtcgccttc ccgttccgct atcggctgaa 6600
 tttgattgcy agtgagatat ttatgccagc cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac 6660
 ttaatggtcc cgtaacagc gcgatttgct gatgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc 6720
 ccagtcgcgt accgtcttca tgggagaaaa taatactggt gatgggtgtc tggtcagaga 6780
 catcaagaaa taacgccgga acattagtgc aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt 6840
 catccagcgg atagttaatg atcagcccac tgacgcggtg cgcgagaaga ttgtgcaccg 6900
 ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt ctaccatcga caccaccacg ctggcaccga 6960
 gttgatcggc gcgagattta atcgcgcgga caatttgca cggcgcgtgc agggccagac 7020
 tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact gtttgcccgc cagttggtgt gccacgcggt 7080
 tgggaatgta attcagctcc gccatcgcg cttccacttt ttcccgcggt ttcgagaaa 7140
 cgtggtcggc ctggttcacc acgcgggaaa cggctctgata agagacaccg gcatactctg 7200
 cgacatcgtg taacggtact ggtttcacat tcaccac 7237

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 501-L

10

<400> 19
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

ES 2 735 981 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 20
 <211> 226
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 501-H

10 <400> 20
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu
 100 105 110

Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys
 115 120 125

ES 2 735 981 T3

Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro Tyr Arg Met Ala Trp Tyr Arg
130 135 140

Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val Ala Asp Ile Ser Ser Gly
145 150 155 160

Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr
165 170 175

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

Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Val Ser
195 200 205

Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
210 215 220

Ser Ser
225

<210> 21
<211> 227
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 514-L

10 <400> 21
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Phe
50 55 60

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

Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

ES 2 735 981 T3

Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 22
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 514-H

10

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Glu Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15

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

Asn Met Gly Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Thr Trp Ser Gly Arg Asp Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

ES 2 735 981 T3

<213> Artificial

<220>

<223> 515-L

5

<400> 23

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Phe
50 55 60

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

Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
115 120 125

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
180 185 190

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
210 215 220

Gly Glu Cys
225

10

<210> 24

<211> 345

<212> PRT

<213> Artificial

15

ES 2 735 981 T3

<220>

<223> 515-H

<400> 24

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ala Gly Ser Ile Phe Ser Phe Ala
20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
35 40 45

Arg Ile Gly Ser Asp Asp Arg Val Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Arg Thr Ala Gly Leu Gln
65 70 75 80

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

Gln Thr Asp Leu Arg Asp Trp Thr Val Arg Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

5

ES 2 735 981 T3

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

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

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

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

Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly
 225 230 235 240

Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro
 245 250 255

Tyr Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu
 260 265 270

Val Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp
 275 280 285

Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Asn Thr
 290 295 300

Val Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 305 310 315 320

Tyr Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly
 325 330 335

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 340 345

<210> 25
 <211> 227
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 1214-L

10 <400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Glu
 1 5 10 15

ES 2 735 981 T3

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Phe
 50 55 60

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

Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 26
 <211> 348
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> 1214-H

10 <400> 26

ES 2 735 981 T3

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

ES 2 735 981 T3

Gln Ala Gly Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr
 245 250 255

Phe Thr Pro Tyr Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln
 260 265 270

Arg Asp Leu Val Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn
 275 280 285

Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile
 290 295 300

Lys Asn Thr Val Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr
 305 310 315 320

Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg
 325 330 335

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 340 345

<210> 27
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 1215-L

10

<400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Phe Val Gln Ala Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Thr Ser Ser Thr Leu Thr Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Arg Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Asp Leu Val
 35 40 45

Ala Asp Ile Ser Ser Gly Asp Gly Arg Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Phe
 50 55 60

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

Phe Leu Arg Met Thr Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

ES 2 735 981 T3

Cys Asn Thr Phe Val Ser Phe Val Gly Ile Ala Arg Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125

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

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160

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

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190

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

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220

Gly Glu Cys
 225

<210> 28
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> 1215-L

10

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Val Val Ala Gly Ser Ile Phe Ser Phe Ala
 20 25 30

Met Ser Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val Ala
 35 40 45

Arg Ile Gly Ser Asp Asp Arg Val Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ile Lys Arg Thr Ala Gly Leu Gln

<213> Artificial

<220>

<223> espaciador AA

5

<400> 29

Ala Ala Ala

1

<210> 30

10

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> espaciador DKT

<400> 30

Asp Lys Thr

1

20

REIVINDICACIONES

1. Un formato de unión a antígeno que consiste en:
 - una primera proteína de fusión en la que el dominio constante CH1 de un anticuerpo está fusionado i) por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único y ii) por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único, en donde el dominio constante CH1 de la primera proteína de fusión está fusionado por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único a través del espaciador DKT y,
 - una segunda proteína de fusión en la que el dominio constante CL de un anticuerpo está fusionado por su extremo N-terminal con el extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único.
2. El formato de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que dicho dominio CL es de una cadena ligera lambda (λ) o kappa (κ).
3. El formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones precedente, en el que dicho dominio CH1 es de una IgG, tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o de una IgA, IgD, IgE o IgM.
4. El formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo de dominio único es específico para una molécula reguladora de una célula inmunitaria o para un antígeno del cáncer.
5. El formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en
 - una primera proteína de fusión que consiste en un dominio constante CH1 de un anticuerpo fusionado directamente por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único, y fusionado a través del espaciador DKT por su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un anticuerpo de dominio único y,
 - una segunda proteína de fusión que consiste en un dominio CL de un anticuerpo fusionado directamente por su extremo N-terminal al extremo C-terminal de un anticuerpo de dominio único.
6. El formato de unión a antígeno según cualquiera las reivindicaciones precedentes, que es mono-, bi- o tri-específico hacia el antígeno.
7. El formato de unión a antígeno según la reivindicación 6, en el que dos anticuerpos de dominio único son específicos para un antígeno de cáncer y el último anticuerpo de dominio único es específico para una molécula reguladora de células inmunes.
8. El formato de unión a antígeno según la reivindicación 6, en el que el primer anticuerpo de dominio único es específico para un antígeno de cáncer, el segundo anticuerpo de dominio único es específico para una primera molécula reguladora de las células inmunitarias, y el tercer anticuerpo de dominio único es específico para una segunda molécula reguladora de células inmunitarias.
9. Una molécula de ácido nucleico que codifica un formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
10. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9.
11. Una célula hospedadora procariota o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 9 o un vector según la reivindicación 10.
12. Un método para producir un formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula hospedadora transformada según la reivindicación 11 bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho formato de unión a antígeno; y (ii) recuperar el formato de unión a antígeno expresado.
13. Una composición farmacéutica que comprende un formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
14. El formato de unión a antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso como medicamento.

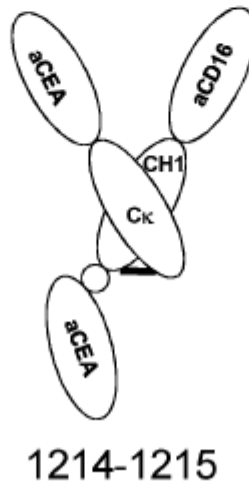
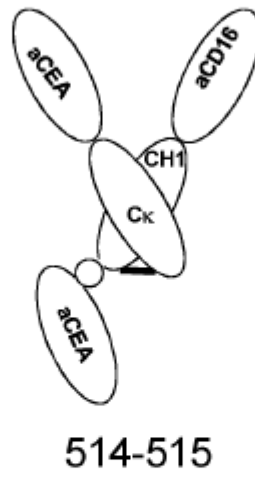


Figura 1

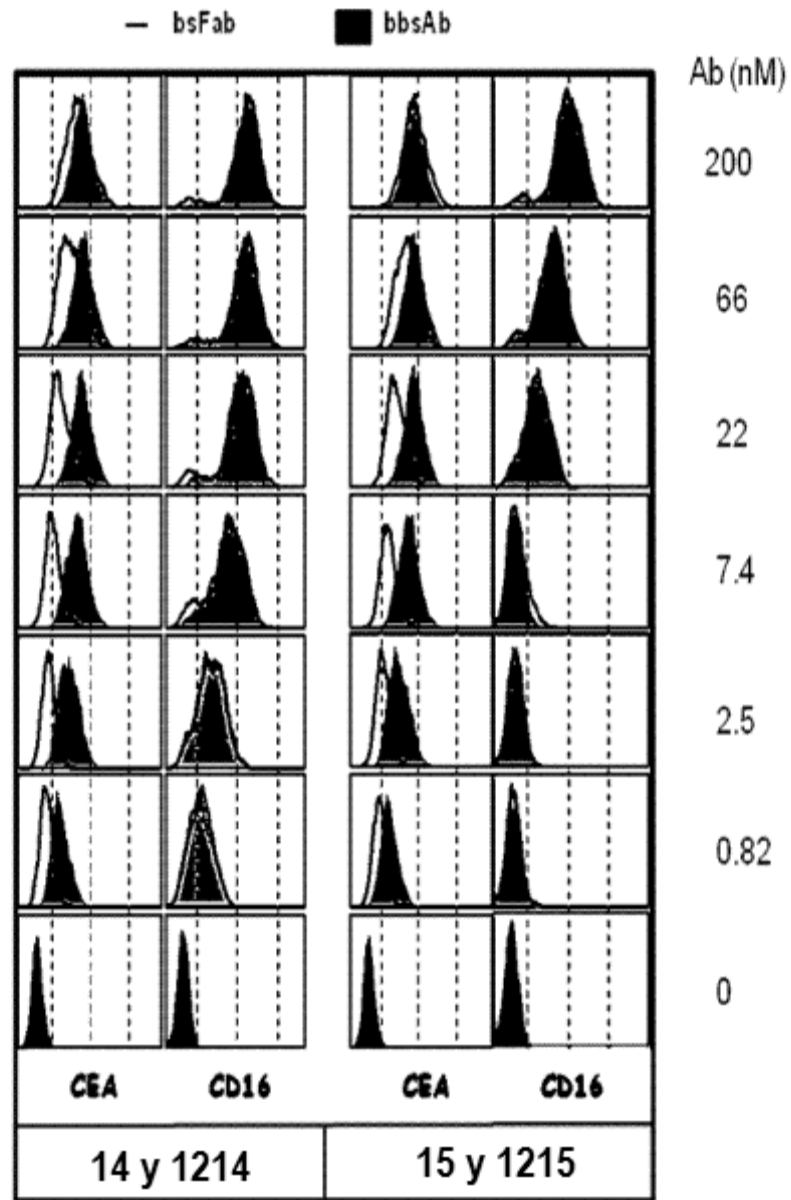


Figura 2

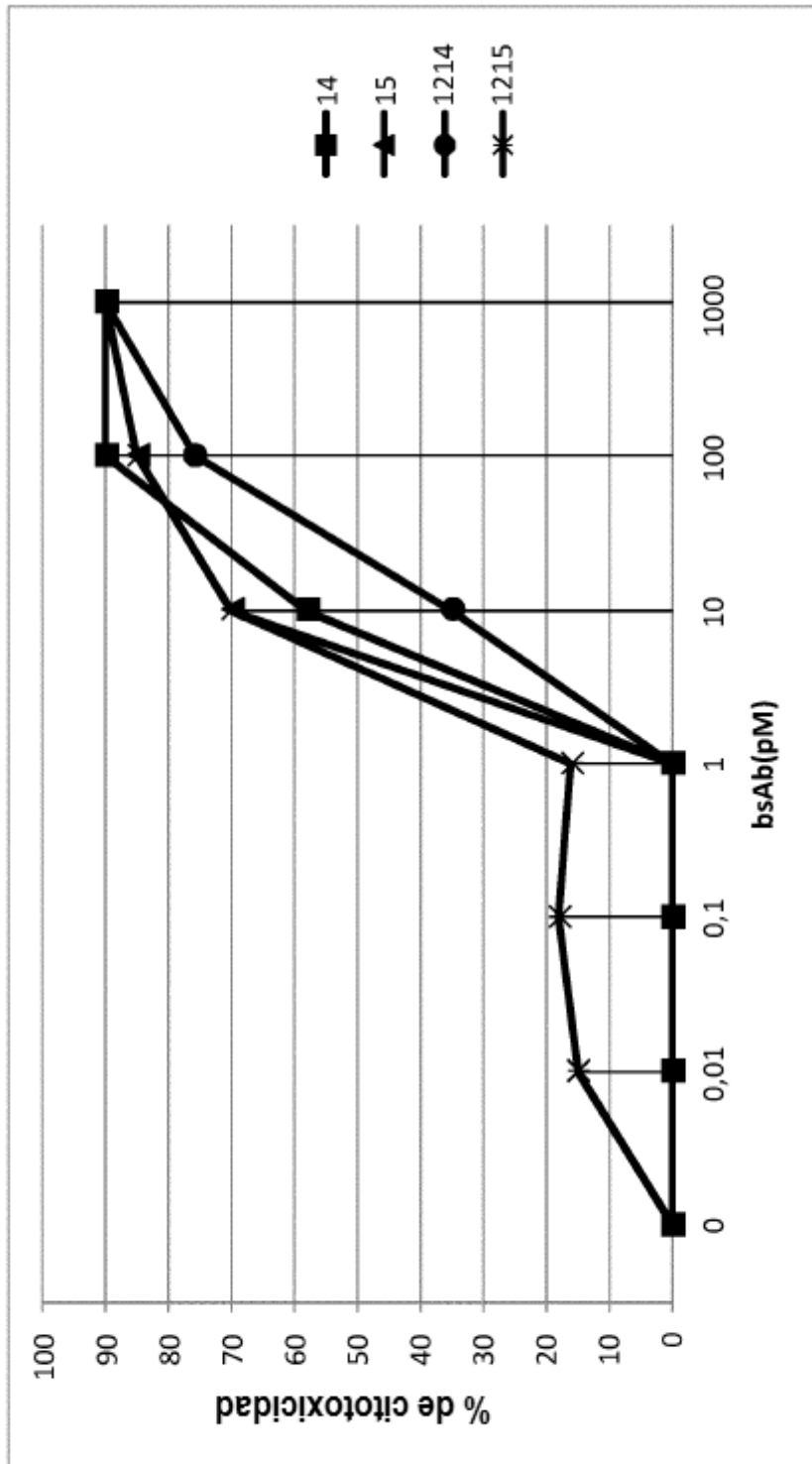


Figura 3