

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 386**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2012 PCT/US2012/070146**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096221**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2012 E 12808642 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2794650**

54 Título: **Polipéptidos Fc variantes con unión potenciada al receptor de Fc neonatal**

30 Prioridad:

21.12.2011 US 201161578780 P
12.01.2012 US 201261585993 P
21.11.2012 US 201261729050 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2020

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

72 Inventor/es:

SUN, JEONGHOON;
HAN, SEOG JOON;
HARRIS, SUSIE M.;
KETCHEM, RANDAL R.;
LU, JI;
MICHAELS, MARK L.;
RETTTER, MARC W. y
TSAI, MEI-MEI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 751 386 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

Polipéptidos Fc variantes con unión potenciada al receptor de Fc neonatal

Prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de las solicitudes provisionales de Estados Unidos n.º 61/578.780, 61/585.993 y 61/729.050, presentadas el 21 de diciembre de 2011, el 12 de enero de 2012 y el 21 de noviembre de 2012, respectivamente, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria en su totalidad.

Campo

10 La invención se refiere a polipéptidos que comprenden fragmentos de Fc variantes que se unen al receptor de Fc neonatal con mayor afinidad y/o mayor actividad de unión en comparación con un fragmento de Fc de control. La invención se refiere además a métodos de aislamiento, preparación y uso de dichos polipéptidos.

Antecedentes

15 Los anticuerpos monoclonales terapéuticos se han usado satisfactoriamente como tratamientos para una diversidad de enfermedades. La semivida *in vivo* relativamente largo de los anticuerpos está mediada al menos en parte por la interacción de la región Fc del anticuerpo con el receptor de Fc neonatal (FcRn). Véase, por ejemplo, Ghetie *et al.* (1996), Eur. J. Immunol. 26: 690-96. FcRn se une a la región Fc de anticuerpos IgG con afinidad nanomolar ($K_D \approx 100$ nM) a un pH de menos de o igual a 6,0, pero no se une al pH de la sangre, es decir, aproximadamente pH 7,4. Tesar y Björkman (2001), Curr. Opin. Struct. Biol. 20(2): 226-233. Tras la internalización de un anticuerpo por una célula, por ejemplo, por pinocitosis, una IgG puede unirse por FcRn en el entorno ácido de un endosoma. *Id.* Cuando se une por FcRn dentro del endosoma, la IgG se dirigirá de nuevo a la superficie celular, en oposición a la entrada en una ruta catabólica por defecto dentro del endosoma. *Id.* En el entorno de pH en general fisiológico en la superficie celular, la IgG puede disociarse de FcRn y volver a entrar en la circulación. Este proceso permite que el anticuerpo regrese a la circulación después de la internalización dentro de una célula, en oposición a degradarse en la célula dentro de un endosoma.

25 La publicación internacional número WO 2005/047327 A2 (Biogen IDEC MA Inc.; Cambridge MA (US)) divulga métodos de generación de variantes de Fc que muestran unión diferencial a FcRn a, por ejemplo, pH 6,0 en comparación con pH 7,4. Los polipéptidos que contienen Fc (anticuerpos y proteínas de fusión que contienen una región Fc o una parte biológicamente activa de la misma) pueden modificarse en uno, dos o más restos de aminoácido (pero en general no más de diez restos) adyacentes a una o más posiciones de la región Fc identificadas por conferir unión a FcRn por la región Fc.

30 La publicación internacional número WO 2008/119096 A1 (F-Star Biotechnologische Forschungs- und Entwicklungsges.m.b.H.; Vienna (AT)) divulga métodos de producción de variantes de IgG que muestran mayor afinidad de unión a FcRn a pH 5-7 que a pH 7,1 a 7,6. Estas variantes comprenden sustitución, eliminación y/o inserción de dos o más restos de aminoácido, preferiblemente mutaciones puntuales o mutación de hasta 20, 25 o 30 restos de aminoácido de bucles de la región Fc seleccionados (siendo el bucle 5 particularmente preferido), para conseguir prolongación de la semivida *in vivo* con la retención de la actividad biológica.

35 La publicación internacional número WO 2009/058492 A2 (Xencor, Inc.; Monrovia CA, (US)) divulga variantes de Fc, métodos de manipulación para su generación y optimización, y su aplicación, particularmente con fines terapéuticos. Se propone la preparación de variantes que muestran retención aumentada en suero *in vivo*: la inserción o eliminación de restos de aminoácido en ubicaciones de bucle de la región Fc seleccionadas aumenta la afinidad de unión entre el polipéptido Fc y FcRn a aproximadamente pH 6,0, mientras se mantiene afinidad menor a pH 7,4.

40 Hay una necesidad en la técnica de anticuerpos con semividas *in vivo* aumentadas para disminuir las cantidades y/o frecuencias de dosificación. Dichos anticuerpos son ventajosos a causa de una conveniencia aumentada por parte del paciente y, por lo tanto, también un cumplimiento posiblemente aumentado por parte del paciente, y/o costes disminuidos. En el entorno actual de asistencia sanitaria consciente de los costes, los costes pueden ser un factor determinante en la utilidad práctica de un producto terapéutico.

Compendio

La presente invención se define por las reivindicaciones.

50 Se proporcionan fragmentos de Fc variantes que se unen a FcRn con mayor afinidad y/o mayor actividad de unión que un fragmento Fc de control a un pH ligeramente ácido y que se unen a FcRn con aproximadamente la misma afinidad o menor que un fragmento de Fc de control, es decir, poca o ninguna actividad de unión, a un pH fisiológico. También se proporcionan polipéptidos Fc variantes, que contienen un fragmento Fc variante, así como una región de unión que se une a una molécula diana. Se demuestra en la presente memoria que polipéptidos Fc variantes que contienen fragmentos de Fc variantes con las propiedades de unión mencionadas anteriormente también tienen semividas *in vivo* más largas que los polipéptidos Fc de control. Se proporcionan además ácidos nucleicos que

codifican estos fragmentos de Fc y polipéptidos Fc y métodos de preparación de estas proteínas usando estos ácidos nucleicos. También se incluyen métodos para prolongar la semivida *in vivo* de un polipéptido Fc y métodos para identificar fragmentos de Fc variantes que se unen a FcRn con mayor afinidad a pH 5-6 y se unen a FcRn con afinidad comparable o inferior a pH fisiológico en comparación con un fragmento de Fc de control.

5 Aquí se describe un polipéptido Fc variante que comprende un fragmento Fc variante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en el que el fragmento de Fc variante comprende una inserción de 3 a 20, de 10 a 20, de 20 a 40, 40 a 60 o de 60 a 80 aminoácidos dentro de o adyacente al bucle 5, 8 y/o 10 del fragmento de Fc variante, en el que el polipéptido Fc variante se une a un receptor de Fc neonatal humano (hFcRn) con mayor afinidad y/o mayor actividad de unión a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y/o a un pH de aproximadamente 5,0, 5,2, 5,5, 5,7 o 6,0 que un polipéptido Fc de control que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido Fc variante excepto que no contiene la inserción dentro de o adyacente al bucle 5, 8 y/o 10 y en el que el polipéptido Fc variante se une al receptor Fc neonatal humano (hFcRn) con aproximadamente la misma afinidad o actividad de unión o inferior en comparación con el polipéptido Fc de control, es decir, poca o ninguna actividad de unión, a un pH fisiológico y/o a un pH de aproximadamente 7,4, 7,5 o 7,6. La inserción dentro de o adyacente al fragmento de Fc variante puede ser de al menos seis aminoácidos de longitud, no más de 25 aminoácidos de longitud, de 6 a 16 aminoácidos de longitud y/o al menos 12 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la inserción no contiene restos de metionina y/o triptófano. La inserción dentro de o adyacente al fragmento de Fc variante puede comprender al menos una cisteína entre los primeros cuatro aminoácidos insertados y al menos una cisteína entre los últimos cuatro aminoácidos insertados. Opcionalmente, la inserción puede carecer de restos de cisteína distintos de cualquier resto de cisteína que aparezca en los cuatro primeros o últimos aminoácidos de la inserción. En algunas realizaciones, la inserción es dentro de o adyacente al bucle 10 del fragmento de Fc variante, opcionalmente entre los aminoácidos 384 y 385 del fragmento de Fc variante usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. La inserción puede ser dentro de los aminoácidos 383 a 387 usando el sistema de numeración EU. En algunas realizaciones, la inserción en el fragmento de Fc humano variante puede ser entre los aminoácidos 382 y 383, 383 y 384, 385 y 386, 386 y 387, 387 y 388, 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. Como alternativa, pueden eliminarse los aminoácidos 384-386, y la inserción puede ser entre los aminoácidos 383 y 387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. Como se describe en la presente memoria, la inserción en el fragmento de Fc variante puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 90-356 y 359-379. Además, la inserción en el fragmento de Fc variante puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 41-67; SEQ ID NO: 90-246; SEQ ID NO: 247-356; SEQ ID NO: 367, 369, 372, 373 y 375-379; los aminoácidos 4-9 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-53, 67, 90-162, 90-163, 165-215, 164-214, 217-247, 216-246, 359-379 y 392-399, 401-409, 411-426, 428-439, 441-447, 449-453, 456, 459, 461, 464 y 470, 475, 477-489, 491-496; los aminoácidos 4-10 de las SEQ ID NO: 164, 252 y 490 y los aminoácidos 4-8 de la SEQ ID NO: 215 o 216; los aminoácidos 4-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 248-288, 290-306, 342, 400, 410, 427, 440, 448, 454, 455, 457, 458, 460, 465-469, 471-474 y 476; los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO: 289 o 307; y los aminoácidos 4-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 308-341 y 343-356.

En la presente memoria se describe además un polipéptido Fc variante que comprende un fragmento de Fc variante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, en el que el fragmento de Fc variante comprende una inserción de 3 a 20, de 10 a 20, de 20 a 40, de 40 a 60 o de 60 a 80 aminoácidos dentro de o adyacente al bucle 10, en el que el polipéptido Fc variante se une a un hFcRn con mayor afinidad y/o mayor actividad de unión a un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y/o a un pH de aproximadamente 5,0, 5,2, 5,5, 5,7 o 6,0 que un polipéptido Fc de control que es igual que el polipéptido Fc variante excepto que no contiene la inserción dentro de o adyacente al bucle 10 y en el que el polipéptido Fc variante se une al hFcRn con aproximadamente la misma afinidad o inferior en comparación con el polipéptido Fc de control, es decir, con poca o ninguna actividad de unión, a un pH fisiológico y/o a un pH de aproximadamente 7,4, 7,5 o 7,6. La inserción puede ser de al menos seis aminoácidos de longitud, puede ser de no más de 25 aminoácidos de longitud, puede ser de 6 a 16 aminoácidos de longitud, puede ser de al menos 12 aminoácidos de longitud y/o puede contener al menos una cisteína entre los cuatro primeros aminoácidos de la inserción y al menos una cisteína entre los cuatro últimos aminoácidos de la inserción. La inserción puede carecer de restos de cisteína en otras posiciones dentro de la inserción. La inserción puede carecer de restos de metionina y/o triptófano. La inserción en el fragmento de Fc variante puede ser dentro de los aminoácidos 383-387 de acuerdo con el sistema de numeración EU. La inserción en el fragmento de Fc variante puede ser entre los aminoácidos 382 y 383, 383 y 384, 384 y 385, 385 y 386, 386 y 387, 387 y 388, 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. Como alternativa, pueden eliminarse los aminoácidos 384-386, y la inserción puede producirse entre los aminoácidos 383 y 387, usando el sistema de numeración EU. La inserción en el fragmento de Fc variante puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 90-356, 359-379 y 392-496. Además, la inserción en el fragmento de Fc variante puede comprender la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 41-67; SEQ ID NO: 90-246; SEQ ID NO: 247-356; SEQ ID NO: 367, 369, 372, 373 y 375-379; los aminoácidos 4-9 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-53, 67, 90-162, 90-163, 165-215, 164-214, 217-247, 216-246, 359-379 y 392-399, 401-409, 411-426, 428-439, 441-447, 449-453, 456, 459, 461, 464 y 470, 475, 477-489, 491-496; los aminoácidos 4-10 de las SEQ ID NO: 164, 252 y 490 y los aminoácidos 4-8 de la SEQ ID

NO: 215 o 216; los aminoácidos 4-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 248-288, 290-306, 342, 400, 410, 427, 440, 448, 454, 455, 457, 458, 460, 465-469, 471-474 y 476; los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO: 289 o 307; y los aminoácidos 4-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 308-341 y 343-356. El polipéptido Fc variante puede ser una proteína de fusión de Fc variante que comprende un polipéptido que no es de anticuerpo. En aspectos particulares, una proteína de fusión de Fc de control para la proteína de fusión de Fc variante puede ser alfacept, rilonacept, aflibercept, etanercept, romiplostim o abatacept. En otros aspectos, el polipéptido Fc variante puede comprender una región variable de cadena pesada (V_H) y/o una región variable de cadena ligera (V_L) de cualquier anticuerpo y también puede comprender una primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) y una región constante de cadena ligera (C_L). En algunos aspectos, el polipéptido Fc variante puede comprender (a) una cadena pesada que comprende una región V_H , una primera región constante de cadena pesada (C_{H1}), una región de bisagra, una región C_{H2} y una región C_{H3} , y (b) cadena ligera que comprende una región V_L y una región constante de cadena ligera (C_L). El polipéptido Fc variante puede ser monovalente. El polipéptido Fc variante puede ser dímero o puede ser un tetramero.

En aspectos adicionales, se describen en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos Fc variantes o los fragmentos Fc variantes descritos en la presente memoria, así como las inserciones dentro de o adyacentes a los bucles de los fragmentos de Fc variantes. También se describen células hospedadoras que contienen dichos ácidos nucleicos. También se contemplan métodos de preparación de un polipéptido Fc variante o fragmento de Fc variante, que comprende (a) introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc en una célula hospedadora, (b) cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico en condiciones tales que el ácido nucleico se expresa y (c) recuperar el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc expresado del medio de cultivo o la masa celular, en el que el fragmento de Fc variante o el polipéptido Fc variante que contiene un fragmento de Fc variante comprende una inserción de 3 a 20, de 10 a 20, de 20 a 40, de 40 a 60 o de 60 a 80 aminoácidos dentro de o adyacente al bucle 5, 8 y/o 10 del fragmento de Fc variante, y en el que el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc se une a un hFcRn con afinidad mayor y/o actividad de unión mayor a un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y/o a un pH de aproximadamente 5,0, 5,2, 5,5, 5,7 o 6,0 que un polipéptido Fc o fragmento de Fc de control y en el que el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc se une al receptor de Fc neonatal humano (hFcRn) con aproximadamente la misma afinidad o actividad de unión o inferior en comparación con el polipéptido Fc de control o fragmento de Fc de control, es decir, con poca o ninguna actividad de unión, a un pH fisiológico y/o a un pH de aproximadamente 7,4, 7,5 o 7,6.

También se describen métodos para preparar cualquiera de los fragmentos de Fc o polipéptidos Fc variantes descritos en la presente memoria, que comprenden (a) introducir un ácido nucleico que codifica el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc en una célula hospedadora, (b) cultivar la célula hospedadora que comprende el ácido nucleico en condiciones tales que se expresa el ácido nucleico y (c) recuperar el polipéptido Fc variante o fragmento de Fc expresado del medio de cultivo o la masa celular.

En un aspecto adicional, se describe en la presente memoria un método para prolongar la semivida de un polipéptido Fc que comprende un fragmento de Fc de IgG humana que comprende las siguientes etapas: seleccionar un sitio dentro de o adyacente al bucle 5, 8 y/o 10 para inserción; e insertar un péptido en el sitio seleccionado, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 41-67; SEQ ID NO: 90-246; SEQ ID NO: 247-356; SEQ ID NO: 367, 369, 372, 373 y 375-379; los aminoácidos 4-9 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-53, 67, 90-162, 90-163, 165-215, 164-214, 217-247, 216-246, 359-379 y 392-399, 401-409, 411-426, 428-439, 441-447, 449-453, 456, 459, 461, 464 y 470, 475, 477-489, 491-496; los aminoácidos 4-10 de las SEQ ID NO: 164, 252 y 490 y los aminoácidos 4-8 de la SEQ ID NO: 215 o 216; los aminoácidos 4-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 248-288, 290-306, 342, 400, 410, 427, 440, 448, 454, 455, 457, 458, 460, 465-469, 471-474 y 476; los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO: 289 o 307; y los aminoácidos 4-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 308-341 y 343-356. El sitio seleccionado puede ser dentro de o adyacente al bucle 10, y el sitio de inserción puede ser entre los aminoácidos 384 y 385, numerados de acuerdo con el sistema de numeración EU. El sitio de inserción puede ser dentro de los aminoácidos 383 a 387 usando el sistema de numeración EU. La inserción en el fragmento de Fc variante puede ser entre los aminoácidos 382 y 383, 383 y 384, 384 y 385, 385 y 386, 386 y 387, 387 y 388, 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. Como alternativa, pueden eliminarse los aminoácidos 384-386, y la inserción puede producirse entre los aminoácidos 383 y 387, usando el sistema de numeración EU.

En la presente memoria se describe además un método para identificar un fragmento de Fc variante de IgG humana que confiere una semivida *in vivo* más larga a un polipéptido Fc variante que comprende el fragmento de Fc variante, en comparación con un polipéptido Fc de control, que comprende las siguientes etapas: (a) crear una colección de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc que contienen una inserción que comprende 4-20, 10 a 20, 20-40, 40-60 o 60-80 aminoácidos aleatorizados dentro de o adyacentes al bucle 10; (b) cribar los fragmentos de Fc codificados por la colección para identificar los fragmentos de Fc variantes que (i) se unen a FcRn humano con mayor afinidad y/o mayor actividad de unión a pH 5,5 y/o a un pH de aproximadamente 5-6, que un fragmento de Fc de control y (ii) se unen al FcRn humano a la misma afinidad o actividad de unión o inferior en comparación con el fragmento de Fc de control, es decir, con poca o ninguna actividad de unión, a pH fisiológico y/o a un pH de 7,4, 7,5 o 7,6; (c) construir un ácido nucleico que codifica un polipéptido Fc variante que comprende un fragmento de Fc variante identificado en (b), en el que la concentración de un polipéptido Fc de control, que comprende un fragmento de Fc de control en el lugar del fragmento de Fc variante, se sabe que disminuye linealmente a lo largo

del tiempo cuando se administra a un animal *in vivo*; (d) introducir el ácido nucleico de (c) en una célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora en condiciones tales que puede expresarse el polipéptido Fc variante codificado por el ácido nucleico; (e) recuperar el polipéptido Fc variante de la masa celular o medio de cultivo celular; (f) administrar el polipéptido Fc variante a un animal y administrar el polipéptido Fc de control a otro animal; y (g) controlar las concentraciones de los polipéptidos Fc variantes y de control en sangre periférica a lo largo del tiempo después de la administración, identificando de ese modo un fragmento de Fc variante que confiere una semivida *in vivo* más larga a un polipéptido Fc variante. La inserción de la etapa (a) puede ser entre las posiciones 384 y 385 usando el sistema de numeración EU como se ilustra en la tabla 1. El sitio de inserción puede ser dentro de los aminoácidos 383 a 387 usando el sistema de numeración EU. La inserción en el fragmento de Fc variante puede ser entre los aminoácidos 382 y 383, 383 y 384, 384 y 385, 385 y 386, 386 y 387, 387 y 388, 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1. Como alternativa, pueden eliminarse los aminoácidos 384-386, y la inserción puede producirse entre los aminoácidos 383 y 387, usando el sistema de numeración EU.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una enfermedad crónica, que comprende administrar a un paciente que lo necesita un polipéptido Fc variante como se describe en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de cintas de la estructura tridimensional predicha de partes de FcRn humano (hFcRn) y un fragmento de Fc de IgG1 humana que entra en contacto muy estrecho tras unión de FcRn al fragmento de Fc. En la parte superior hay un diagrama de cintas de una parte de la estructura terciaria de hFcRn. Debajo hay un diagrama de cintas de una parte de un fragmento de Fc de IgG1 humana que entra en contacto muy estrecho con FcRn cuando se une FcRn al mismo. Los bucles se muestran como cordones, mientras que las hélices alfa y láminas beta se muestran como cintas. Los seis sitios en los que se hicieron las inserciones se indican por los nombres de las ocho colecciones que se construyeron como se describe a continuación, es decir, L1, L2A, L2B, L3, L4, L5, L6A y L6B.

Figura 2: Formato de las colecciones de inserción. En la parte superior se muestra la secuencia de un fragmento de Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 1). Los aminoácidos dentro de los bucles en que, o adyacentes a los que, se hicieron inserciones se indican por subrayado y negrita. Los nombres de las colecciones, es decir, L1, L2A, etc., aparecen encima de la región en la que se hicieron las inserciones para esa colección particular. El formato de las inserciones se indica debajo. En el lado izquierdo están los nombres de las colecciones, es decir, L1, L2A, etc. Justo a la derecha de los nombres de la colección está la secuencia original alrededor del sitio de inserción antes de la inserción de cualquier aminoácido. Las letras en cursiva indican aminoácidos que se eliminan antes de la inserción. Una línea discontinua vertical indica el sitio de inserción en aquellas colecciones en que no se eliminaron aminoácidos. En el lado derecho está la secuencia alrededor del sitio de inserción con la inserción en su sitio. Las denominaciones "(19R)₅" o "(19R)₆" significan cinco o seis, respectivamente, aminoácidos aleatorizados, que pueden ser cualquiera de los 19 aminoácidos distintos de cisteína. La denominación "(20R)₈" significa ocho aminoácidos aleatorizados, que pueden ser cualquiera de los veinte aminoácidos.

Figura 3: Curvas de asociación y disociación a pH 6 y pH 7,4, respectivamente, de fragmentos de Fc variantes de la colección L5. Las curvas a la izquierda muestran la respuesta detectada usando el sistema ForteBio Octet® como se explica en el ejemplo 4, donde las partes de las curvas a la izquierda de la línea vertical central muestran las cantidades relativas de asociación de los diversos fragmentos de Fc a FcRn a pH 6 y las partes de las curvas a la derecha de la línea vertical central muestran la disociación de los fragmentos de Fc de FcRn a pH 7,4. La tabla a la derecha proporciona la respuesta de unión máxima detectada a pH 6 para cada variante y para un fragmento de Fc de tipo silvestre (FcWT).

Figura 4: Promedio de concentraciones de anticuerpos que contienen fragmentos de Fc variantes y de control como una función del tiempo tras la inyección en macacos cangrejeros. El eje x indica el tiempo en horas tras la inyección, y el eje y indica la concentración del anticuerpo en nanogramos por mililitro (ng/ml) en sangre periférica de macacos cangrejeros a los que se ha inyectado un anticuerpo.

Figura 5: Secuencias de variantes del bucle 10. Se muestran las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre o las versiones variantes de un bucle en un fragmento de Fc de IgG1 humana, más tres aminoácidos adyacentes en cualquier lado. La secuencia de aminoácidos mostrada es de los restos de aminoácido 166-178, en el esquema de numeración de la figura 2, o los aminoácidos 381-393 de acuerdo con la numeración EU (SEQ ID NO: 563) como se muestra en esta figura y en la tabla 1. La secuencia de la región de bucle de tipo silvestre inalterada se denomina "secuencia de tipo silvestre". La secuencia de esta región de bucle en la variante 5-1 de Fc (codificada por un aislado de la colección L5) se denomina "5-1" (SEQ ID NO: 564). Las secuencias de aminoácidos insertadas se muestran en **negrita con subrayado**. La secuencia de esta misma región de bucle de diversas variantes de 5-1, que tienen el mismo péptido insertado en diferentes ubicaciones dentro de o adyacente a este bucle, en algunos casos con algunos aminoácidos del bucle eliminados, se muestran debajo.

Figura 6: Curvas de asociación y disociación a pH 6 y pH 7,4, respectivamente, de fragmentos de Fc variantes que tienen la misma inserción en diferentes posiciones del bucle 10. A la izquierda se muestran las curvas de asociación

a pH 6 (a la izquierda de la línea vertical central) y las curvas de disociación a pH 7,4 (a la derecha de la línea vertical central) de los diversos fragmentos de Fc variantes y un fragmento de Fc de tipo silvestre (FcWT). A la derecha, se muestra la respuesta de unión máxima detectada para cada variante a pH 6 en forma de tabla.

Figura 7: Curvas de asociación y disociación a pH 6 y pH 7,4 de fragmentos de Fc variantes de la colección L5 cribados en levadura. A la izquierda se muestran las curvas de asociación a pH 6 (a la izquierda de la línea vertical central) y las curvas de disociación a pH 7,4 (a la derecha de la línea vertical central) de los diversos fragmentos de Fc variantes y un fragmento de Fc de tipo silvestre (FcWT). A la derecha se muestra la respuesta de unión máxima detectada para cada variante a pH 6 en forma de tabla

Figura 8: Curvas de asociación y disociación a pH 6 y pH 7,4 de fragmentos de Fc variantes de la colección L-8 y L-10 cribados en levadura. A la izquierda se muestran las curvas de asociación a pH 6 (a la izquierda de la línea vertical central) y las curvas de disociación a pH 7,4 (a la derecha de la línea vertical central) de los diversos fragmentos de Fc variantes y un fragmento de Fc de tipo silvestre (FcWT). A la derecha se muestra la respuesta de unión máxima detectada para cada variante a pH 6 en forma de tabla.

Figura 9: Promedio de concentraciones de anticuerpos que contienen fragmentos de Fc variantes y de control como una función del tiempo después de la inyección en macacos cangrejeros. El eje x indica el tiempo en horas después de la inyección y el eje y indica la concentración del anticuerpo en nanogramos por mililitro (ng/ml) en sangre periférica de macacos cangrejeros a los que se ha inyectado un anticuerpo.

Figura 10: Promedio de concentraciones de anticuerpos que contienen fragmentos de Fc variantes y de control como una función del tiempo después de la inyección en macacos cangrejeros. El eje x indica el tiempo en horas después de la inyección y el eje y indica la concentración del anticuerpo en nanogramos por mililitro (ng/ml) en sangre periférica de macacos cangrejeros a los que se ha inyectado un anticuerpo. Como se indica, los círculos rellenos representan datos puntuales individuales para macacos cangrejeros a los que se ha inyectado Y-5-112, y la línea continua representa la media de estos datos. Asimismo, los triángulos representan datos puntuales individuales para macacos cangrejeros a los que se ha inyectado anticuerpo Y, y la línea discontinua representa la media de estos datos.

Breve descripción de las secuencias

Número en la lista de secuencias	Descripción
SEQ ID NO: 1	Secuencia de aminoácidos de una región Fc de IgG1 humana
SEQ ID NO: 2	Secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de IgG1 humana
SEQ ID NO: 3	Secuencia de aminoácidos de una región Fc de IgG2 humana
SEQ ID NO: 4	Secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de IgG2 humana
SEQ ID NO: 5	Secuencia de aminoácidos de una región Fc de IgG3 humana
SEQ ID NO: 6	Secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de IgG3 humana
SEQ ID NO: 7	Secuencia de aminoácidos de una región Fc de IgG4 humana
SEQ ID NO: 8	Secuencia de nucleótidos que codifica una región Fc de IgG4 humana
SEQ ID NO: 9	Secuencia de aminoácidos de cadena alfa de FcRn humano
SEQ ID NO: 10	Secuencia de aminoácidos de cadena de β -2-microglobulina de FcRn humano
SEQ ID NO: 11	Secuencia de aminoácidos de la región extracelular de receptor de factor de necrosis tumoral p75 humano maduro
SEQ ID NO: 12	Secuencia de aminoácidos de la región extracelular de (CTLA4) humano maduro
SEQ ID NO: 13	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (CXXXXXXXXC)
SEQ ID NO: 14	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (CXXXXXXXXC)
SEQ ID NO: 15	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (CXXXXXXXXC)
SEQ ID NO: 16	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GCXXXXXXXXCG)
SEQ ID NO: 17	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GCXXXXXXXXCG)
SEQ ID NO: 18	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GCXXXXXXXXCG)
SEQ ID NO: 19	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGCXXXXXXXXCGG)
SEQ ID NO: 20	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGCXXXXXXXXCGG)
SEQ ID NO: 21	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGCXXXXXXXXCGG)
SEQ ID NO: 22	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGGCXXXXXXXXCGGG)
SEQ ID NO: 23	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGGCXXXXXXXXCGGG)
SEQ ID NO: 24	Secuencia de aminoácidos de secuencia de inserción aleatorizada (GGGCXXXXXXXXCGGG)
SEQ ID NO: 25	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L1
SEQ ID NO: 26	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 25
SEQ ID NO: 27	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L2A
SEQ ID NO: 28	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 27
SEQ ID NO: 29	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L2B
SEQ ID NO: 30	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 29

Número en la lista de secuencias	Descripción
SEQ ID NO: 31	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L3
SEQ ID NO: 32	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 31
SEQ ID NO: 33	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L4
SEQ ID NO: 34	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 35	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L5
SEQ ID NO: 36	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 35
SEQ ID NO: 37	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L6A
SEQ ID NO: 38	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 37
SEQ ID NO: 39	Secuencia de nucleótidos de la parte que codifica el fragmento de Fc de la colección L6B
SEQ ID NO: 40	Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 39
SEQ ID NO: 41	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-51
SEQ ID NO: 42	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-69
SEQ ID NO: 43	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-104
SEQ ID NO: 44	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-106
SEQ ID NO: 45	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-112
SEQ ID NO: 46	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-55
SEQ ID NO: 47	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-60
SEQ ID NO: 48	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-70
SEQ ID NO: 49	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-79
SEQ ID NO: 50	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-85
SEQ ID NO: 51	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-95
SEQ ID NO: 52	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-97
SEQ ID NO: 53	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante Fc-5-99
SEQ ID NO: 54	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-51
SEQ ID NO: 55	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-69
SEQ ID NO: 56	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-104
SEQ ID NO: 57	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-106
SEQ ID NO: 58	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-112
SEQ ID NO: 59	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-55
SEQ ID NO: 60	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-60
SEQ ID NO: 61	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-70
SEQ ID NO: 62	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-79
SEQ ID NO: 63	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-85
SEQ ID NO: 64	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-95
SEQ ID NO: 65	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-97
SEQ ID NO: 66	Secuencia de aminoácidos de los seis aminoácidos centrales de la inserción en Fc-5-99
SEQ ID NO: 67	Secuencia de aminoácidos de la inserción en el fragmento de Fc variante 5-1
SEQ ID NO: 68	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-1
SEQ ID NO: 69	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-1
SEQ ID NO: 70	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-2
SEQ ID NO: 71	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-2
SEQ ID NO: 72	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-3
SEQ ID NO: 73	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-3
SEQ ID NO: 74	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-4
SEQ ID NO: 75	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-4
SEQ ID NO: 76	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-5
SEQ ID NO: 77	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-5
SEQ ID NO: 78	Secuencia de nucleótidos del cebador directo usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-6
SEQ ID NO: 79	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso usado para construir un vector que codifica el polipéptido Fc variante 5-1-6

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Número en la lista de secuencias	Descripción
SEQ ID NO: 349	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-43
SEQ ID NO: 350	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-44
SEQ ID NO: 351	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-45
SEQ ID NO: 352	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-46
SEQ ID NO: 353	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-47
SEQ ID NO: 354	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-48
SEQ ID NO: 355	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-49
SEQ ID NO: 356	Secuencia de aminoácidos de la secuencia de inserción en el fragmento de Fc variante 10y-50
SEQ ID NO: 357	Secuencia de nucleótidos de un cebador
SEQ ID NO: 358	Secuencia de nucleótidos de un cebador
SEQ ID NO: 359	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-57
SEQ ID NO: 360	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-64
SEQ ID NO: 361	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-66
SEQ ID NO: 362	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-73
SEQ ID NO: 363	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-92
SEQ ID NO: 364	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-96
SEQ ID NO: 365	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-110
SEQ ID NO: 366	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante 5-113
SEQ ID NO: 367	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-69-WIF
SEQ ID NO: 368	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-69-WIY
SEQ ID NO: 369	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4A
SEQ ID NO: 370	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4G
SEQ ID NO: 371	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4H
SEQ ID NO: 372	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4I
SEQ ID NO: 373	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4L
SEQ ID NO: 374	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4N
SEQ ID NO: 375	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4Q
SEQ ID NO: 376	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4S
SEQ ID NO: 377	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4T
SEQ ID NO: 378	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-106-M4V
SEQ ID NO: 379	Secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica en el fragmento de Fc variante Fc-5-110
SEQ ID NO: 380	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para preparar el anticuerpo X-5y-8
SEQ ID NO: 381	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para preparar el anticuerpo X-5y-8
SEQ ID NO: 382	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para preparar el anticuerpo X-5y-132
SEQ ID NO: 383	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para preparar el anticuerpo X-5y-132
SEQ ID NO: 384	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para preparar el anticuerpo X-5y-38
SEQ ID NO: 385	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para preparar el anticuerpo X-

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Número en la lista de secuencias	Descripción
	Fc Fc-5-106-M4L
SEQ ID NO: 510	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4L
SEQ ID NO: 511	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4N
SEQ ID NO: 512	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4N
SEQ ID NO: 513	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4Q
SEQ ID NO: 514	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4Q
SEQ ID NO: 515	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4S
SEQ ID NO: 516	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4S
SEQ ID NO: 517	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4T
SEQ ID NO: 518	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4T
SEQ ID NO: 519	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4V
SEQ ID NO: 520	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para preparar la variante de Fc Fc-5-106-M4V
SEQ ID NO: 521	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir las colecciones L1, L2A, L2B, L3, L4 y L5
SEQ ID NO: 522	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir la colección L1
SEQ ID NO: 523	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir las colecciones L2A y L2B
SEQ ID NO: 524	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir la colección L3
SEQ ID NO: 525	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir la colección L4
SEQ ID NO: 526	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir la colección L5
SEQ ID NO: 527	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir las colecciones L1, L2A, L2B, L3, L4 y L5
SEQ ID NO: 528*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L1
SEQ ID NO: 529*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L2A
SEQ ID NO: 530*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L2B
SEQ ID NO: 531*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L3
SEQ ID NO: 532*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L4
SEQ ID NO: 533*	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L5
SEQ ID NO: 534	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir las colecciones L1, L2A, L2B, L3, L4 y L5
SEQ ID NO: 535	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir las colecciones L1, L2A, L2B, L3, L4 y L5
SEQ ID NO: 536	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L6A
SEQ ID NO: 537#	Secuencia de nucleótidos de un cebador directo de PCR usado para construir la colección L6B
SEQ ID NO: 538	Secuencia de nucleótidos de un cebador inverso de PCR usado para construir las colecciones L6A y L6B
SEQ ID NO: 539	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-51
SEQ ID NO: 540	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-51
SEQ ID NO: 541	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-69
SEQ ID NO: 542	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-69
SEQ ID NO: 543	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-104
SEQ ID NO: 544	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-

Número en la lista de secuencias	Descripción
	104
SEQ ID NO: 545	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-106
SEQ ID NO: 546	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-106
SEQ ID NO: 547	Secuencia de nucleótidos del cebador directo de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-112
SEQ ID NO: 548	Secuencia de nucleótidos del cebador inverso de PCR usado para construir el anticuerpo X-5-112
SEQ ID NO: 549	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 36-41 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 251-256 en el esquema de numeración EU
SEQ ID NO: 550	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 251-256 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L1
SEQ ID NO: 551	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 92-99 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 307-314 en el sistema de numeración EU
SEQ ID NO: 552	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 307-314 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L2A
SEQ ID NO: 553	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 307-314 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L2B
SEQ ID NO: 554	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 213-221 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a 428-436 en el esquema de numeración EU
SEQ ID NO: 555	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 428-436 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L3
SEQ ID NO: 556	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 68-72 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 283-287 en el esquema de numeración EU
SEQ ID NO: 557	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 283-287 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L4
SEQ ID NO: 558	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 169-174 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 384-389 en el sistema de numeración EU
SEQ ID NO: 559	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 384-389 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L5
SEQ ID NO: 560	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 141-147 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 356-362 en el sistema de numeración EU
SEQ ID NO: 561	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 356-362 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L6A
SEQ ID NO: 562	Secuencia de aminoácidos desde el aminoácido 356-362 en el esquema de numeración EU en los fragmentos de Fc codificados por la colección L6B
SEQ ID NO: 563%	Secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 166 a 178 de la SEQ ID NO: 1, que corresponden a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU
SEQ ID NO: 564%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1
SEQ ID NO: 565%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-1
SEQ ID NO: 566%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-2
SEQ ID NO: 567%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-3
SEQ ID NO: 568%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-4
SEQ ID NO: 569%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-5
SEQ ID NO: 570%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-6
SEQ ID NO: 571%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-7
SEQ ID NO: 572%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-8
SEQ ID NO: 573%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-9
SEQ ID NO: 574%	Secuencia de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 381 a 393 en el sistema de numeración EU del fragmento de Fc variante 5-1-10

Descripción detallada

Los cambios en una proteína terapéutica que aumenta la semivida *in vivo* pueden ser útiles porque dichas proteínas pueden dosificarse en cantidades menores y/o menos frecuencia. La presente invención proporciona polipéptido Fc variantes que comprenden fragmentos de Fc variantes que se unen a FcRn con afinidad y/o actividad de unión aumentada a pH ligeramente ácidos, tales como, por ejemplo, pH 5,0-6,0 y no se unen bien a FcRn a pH fisiológicos de aproximadamente 7,2 a 7,6. Como se demuestra en la presente memoria, dichos polipéptidos Fc variantes que contienen los fragmentos de Fc variantes pueden tener semividas *in vivo* más largas en comparación con polipéptido Fc de control. Se proporcionan polipéptidos Fc variantes que comprenden fragmentos de Fc humano variantes, que contienen al menos una inserción dentro de o adyacente a un bucle, que se unen a FcRn con afinidad y/o actividad de unión potenciada a un pH de aproximadamente 5 a 6 en comparación con polipéptido Fc de control que difieren únicamente en que no contienen la una o más inserciones. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican proteínas que contienen dichos fragmentos de Fc variantes y polipéptidos Fc variantes, células hospedadoras que contienen dichos ácidos nucleicos y métodos de preparación de polipéptidos Fc variantes y fragmentos de Fc variantes. Además, se proporcionan métodos de prolongación de la semivida de un polipéptido Fc, y también se proporcionan métodos de identificación de fragmentos de Fc variantes que se unen a FcRn con mayor afinidad y/o actividad de unión a pH 5-6 con menor afinidad y/o actividad de unión o comparable a un pH fisiológico en comparación con fragmentos de Fc de control.

Un fragmento de Fc variante como se describe en la presente memoria contiene inserciones cortas en sitios seleccionados en los bucles. FcRn interactúa con un fragmento de Fc. Un dominio de inmunoglobulina, tal como el dominio CH2 o CH3, tiene una estructura con forma de barril que comprende partes de lámina beta que alternan con bucles. Hunkapiller y Hood (1989), Adv. Immunol. 44: 1-63; Williams y Barclay (1988), Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405. Se eligieron sitios de inserción en un fragmento de Fc en los bucles que son parte de la zona que entra en contacto relativamente cercano con FcRn cuando se une al fragmento de Fc o en bucles que están adyacentes a estas zonas. La figura 1 muestra diagramas de cintas de parte de FcRn (parte superior) y un fragmento de Fc (parte inferior) e indica las posiciones en el fragmento de Fc de los sitios seleccionados para las inserciones.

Como se mostrará a continuación, muchas inserciones en la colección L5 tienen las propiedades deseadas de unión potenciada a FcRn a pH 5 a 6 y poca o ninguna unión a FcRn a pH fisiológico. Otras colecciones, incluyendo las colecciones L1, L2B, L3 y L4 (véanse las figuras 1 y 2), no producían inserciones que tuvieran las propiedades deseadas, aunque se cribó aproximadamente el mismo número de variantes. Las colecciones L2A, L6A y L6B produjeron algunas inserciones que tienen las propiedades deseadas, aunque los números fueron mucho más pequeños que los números obtenidos de la colección L5. Sorprendentemente, la colección que produjo las inserciones más numerosas con las propiedades deseadas, es decir, la colección L5, recae en una región de bucle que no es parte de la zona que entra en contacto más cercano con FcRn. Figura 1.

Definiciones

El término "**afinidad**", como se entiende en la presente memoria, se refiere a la afinidad de unión medida como una CE₅₀ medida usando un BIAcore® T100 (o un instrumento similar) como se explica en el ejemplo 3. La "afinidad mayor" de un polipéptido Fc variante (que contiene un fragmento de Fc variante), en comparación con un polipéptido Fc de control (que contiene un fragmento de Fc de control), por FcRn significa que el polipéptido Fc variante tiene una CE₅₀ que es de no más de un 50 % de la CE₅₀ del polipéptido Fc de control. Asimismo, la "afinidad menor" de un polipéptido Fc variante, en comparación con un polipéptido Fc de control, significa que el polipéptido Fc variante tiene una CE₅₀ que es de más de un 150 % de la de un polipéptido Fc de control. La afinidad de un polipéptido Fc variante se considera "sustancialmente igual" a la de un polipéptido Fc de control si su CE₅₀ es de un 50-150 % de la CE₅₀ del polipéptido Fc de control.

La expresión "**actividad de unión**", como se entiende en la presente memoria, se refiere a la actividad de unión de un polipéptido Fc a un FcRn medida usando biosensores de estreptavidina recubiertos con FcRn humano (hFcRn) biotinilado en el sistema Octet Red® como se describe en el ejemplo 4 donde se produce asociación a pH 6 y se produce disociación a pH 7,4. La actividad de unión de un polipéptido Fc variante a pH 6 se considera que es "mayor que" la de un polipéptido Fc de control si la respuesta máxima observada en al menos 1,5, 1,75 o 2,0 veces la respuesta máxima observada para el polipéptido Fc de control. La cantidad muy pequeña de respuesta de unión residual, es decir, la respuesta de unión que permanece después de que la mayoría de la proteína se haya disociado de hFcRn a pH 7,4, observada usando un polipéptido Fc de control que comprende un fragmento de Fc de tipo silvestre se menciona como "poca o ninguna actividad de unión". Un polipéptido Fc variante también se considera que tiene "poca o ninguna actividad de unión" a pH 7,4 si la respuesta de unión residual detectada después de que algo o toda la proteína se haya disociado a pH 7,4 es de no más de 0,2 o 0,1 nanómetros más que la detectada usando un polipéptido Fc de control usando el sistema ForteBio como se describe en el ejemplo 4.

Un "**aminoácido**", como se entiende en la presente memoria, se refiere a uno cualquiera de los veinte L aminoácidos habitualmente encontrados en las proteínas humanas, que son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

Un "**anticuerpo**", como se entiende en la presente memoria, es una proteína que contiene al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera, por ejemplo, un scFv, una molécula que comprende dos o más scFv y los anticuerpos de dominio que consisten esencialmente en una única región variable de inmunoglobulina (como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.563.443) son "anticuerpos" como se entiende en la presente memoria. En muchos casos un anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada y una ligera más una región Fc de IgG humana. Por tanto, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos de longitud completa que contienen dos cadenas pesadas de longitud completa y dos ligeras de longitud completa, tal como los anticuerpos IgG IgA, IgD, IgD o IgM de origen natural encontrados en mamíferos. Carayannopoulos y Capra, capítulo 9 en FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 3.^a ed., Paul, ed., Raven Press, Nueva York, 1993, pág. 284-286); las partes de esta referencia que describen anticuerpos se incorporan en la presente memoria por referencia. Anticuerpos ejemplares incluyen adalimumab, (HUMIRA[®], Abbott Laboratories), infliximab (REMICADE[®], Centocor Ortho Biotech Inc.), ustekinumab (STELLARA[®], Centocor), golimumab (SIMPONI[®], Centocor Ortho Biotech), canakinumab (ILARIS[®], Novartis Pharmaceuticals Corporation), ofatumumab (ARZERRA[®], Glaxo Group Ltd.), tocilizumab (ACTEMRA[®], Chugai Seiyaku Kabushiki Corp., Japón), belimumab (BENLYSTA[®], LYMPHOSTAT-B[®], Human Genome Sciences, Inc.), bevacizumab (AVASTIN[®], Genentech), cetuximab (ERBITUX[®], ImClone Systems Inc.), efungumab (MYCOGRAB[®], Novartis AB Corp.), efalizumab, (RAPTIVA[®], Genentech Inc.), etaracizumab (ABEGRIN[®], Medimmune LLC), gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG[®], Wyeth), girentuximab (RENCAREX[®], Willex AG Corp., Alemania), natalizumab (TYSABRI[®], Elan Pharmaceuticals, Inc.), omalizumab (XOLAIR[®], Novartis AG Corp., Suiza), oregovomab (OVAREX[®], AltaRex Corp., Canadá), palivizumab (SYNAGIS[®], ABBOSYNAGIS[®], Medimmune Inc.), panitumumab (VECTIBIX[®], Amgen Inc.), ranibizumab (LUCENTIS[®], Genentech Inc.), rituximab (MABTHERA[®], RITUXAN[®], Idec Pharmaceuticals Corp.) tefibazumab (AUREXIS[®], Inhibitex Corp.), tositumomab, (BEXXAR[®], GlaxoSmithKline Beecham Corp.), trastuzumab (HERCEPTIN[®], Genentech Inc.) y denosumab (PROLIA[®] o XGEVA[®], Amgen Inc.), entre muchos otros. Dichos anticuerpos IgG puede ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 y pueden ser anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados. Además, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos diméricos que contienen dos cadenas pesadas y ninguna cadena ligera, tales como los anticuerpos de origen natural encontrados en camellos, otras especies de dromedario y tiburones. Véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.*, 2001, J. Biotechnol. 74:277-302; Desmyter *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. 276:26285-90; Streltsov *et al.* (2005), Protein Science 14: 2901-2909. Un anticuerpo puede ser monoespecífico (es decir, que se une únicamente a un tipo de antígeno) o multiespecífico (es decir, que se une a más de un tipo de antígeno). En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser biespecífico (es decir, que se une a dos tipos diferentes de antígeno). Además, un anticuerpo puede ser monovalente, bivalente o multivalente, lo que significa que puede unirse a una o dos o más moléculas de antígeno de una vez. Algunos de los posibles formatos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa monoespecíficos o biespecíficos, anticuerpos monovalentes monoespecíficos (como se describe en la solicitud internacional WO 2009/089004 y la publicación de solicitud de Estados Unidos 2007/0105199 y la publicación de solicitud de Estados Unidos 2005/0227324) que pueden inhibir o activar la molécula a la que unen, Fv-Fc dimérico monoespecífico o biespecífico bivalente, scFv-Fc o diacuerpo Fc, scFv-Fc/Fc monovalente monoespecífico y las proteínas de unión multiespecíficas e inmunoglobulinas de dominio variable doble descritas en la publicación de Estados Unidos 2009/0311253, entre muchos otros posibles formatos de anticuerpo.

Una "**región de unión**", como se entiende en la presente memoria, es una región incluida en un "polipéptido Fc", un "polipéptido Fc de control" o "polipéptido Fc variante", como se describe en la presente memoria, que se une a una molécula diana tal como, por ejemplo, una proteína que se expresa a altos niveles en una célula cancerosa, una célula que media una afección autoinmunitaria o inflamatoria, una célula infectada, un agente infeccioso o una célula que media una función efector inmunitaria, por ejemplo, una célula NK. Una región de unión puede contener una región variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera (V_H y/o V_L) o un polipéptido que no es inmunoglobulina. Las regiones de unión ejemplares incluyen, por ejemplo, un Fv (que comprende una región V_H y/o V_L unidas por un conector) o una forma soluble de un receptor humano que se une a una molécula diana.

Un "**fragmento Fc**", como se entiende en la presente memoria, es un polipéptido que consiste en parte o toda una región de bisagra más las regiones C_H2 y C_H3 de un anticuerpo más, opcionalmente, regiones encontradas después de la región C_H3 en algunos isotipos de origen natural tales como anticuerpos IgA o IgM. El anticuerpo puede ser del isotipo IgG, incluyendo los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4, o del isotipo IgM, IgE, IgD o IgA el anticuerpo puede ser de origen humano o animal, por ejemplo, el anticuerpo puede ser de un mamífero, tal como un ratón, rata, hamster, conejo, cabra u oveja, o de una especie de camélido o un tiburón. Las secuencias de fragmentos de Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana se divulgan en las SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7, respectivamente. Estas secuencias también se muestran en la tabla 1 a continuación. En general, los fragmentos de Fc forman dímeros mediante interacciones entre dominios C_H3 dentro de dos fragmentos de Fc, que se estabilizan por enlaces disulfuro que se producen entre restos de cisteína en las regiones de bisagra. Un fragmento de Fc mencionado en la presente memoria como "**región Fc**" se define específicamente como un fragmento de Fc dimérico, aunque se reconoce que los fragmentos de Fc en general dimerizarán en condiciones fisiológicas. Los dímeros pueden disociarse en condiciones fuertemente reductoras.

Un "**polipéptido Fc**", como se entiende en la presente memoria, es una proteína que comprende un fragmento de Fc y una región de unión. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, proteínas de fusión de Fc y anticuerpos o proteínas de fusión que contienen un "resto farmacológicamente activo" adicional, que es un resto orgánico no

peptídico (es decir, "molécula pequeña") o un péptido, que puede actuar como toxina y/o puede imitar, antagonizar o agonizar la actividad de una ruta biológica, conjugado covalentemente o fusionado al polipéptido Fc. Los polipéptidos Fc, como los fragmentos de Fc, habitualmente forman dímeros que se estabilizan por enlaces disulfuro entre restos de cisteína en las regiones de bisagra de dos polipéptidos Fc.

Un "**fragmento de Fc de control**", como se entiende en la presente memoria, es un fragmento de Fc que es igual al "polipéptido Fc variante" con el que se está comparando excepto en que no tiene una inserción en un bucle como el fragmento de Fc variante. Por tanto, el "fragmento de Fc de control" tiene la secuencia sin modificar encontrada en un fragmento de Fc de origen natural en el bucle donde el fragmento de Fc variante tiene una inserción que aumenta la afinidad del fragmento de Fc variante por FcRn a pH 5 a 6. Un fragmento de Fc de control puede contener modificaciones con respecto a un fragmento de Fc de origen natural distintas de la una o más inserciones. Por ejemplo, las alteraciones de heterodimerización u otras modificaciones mínimas descritas a continuación pueden estar presentes tanto en el fragmento de Fc variante como en el fragmento de Fc de control con el que se está comparando. Por tanto, la única diferencia entre un "fragmento de Fc de control" y un "fragmento de Fc variante" es la inserción dentro de o adyacente a un bucle en el fragmento de Fc variante. Una "**región Fc de control**" se define como un dímero que comprende dos fragmentos de Fc de control, aunque un fragmento de Fc de control en general se esperaría que existiera en una forma dimérica.

Un "**fragmento de Fc variante**", como se entiende en la presente memoria, es un fragmento de Fc que incluye una inserción de no más de 80, no más de 60, no más de 40 o no más de 20 aminoácidos dentro de o adyacentes a un bucle del fragmento de Fc. Los bucles en un fragmento de Fc de IgG humana se muestran en la tabla 1, y los bucles en que se hicieron las inserciones se muestran en la figura 2. Se conocen en la técnica bucles en otros fragmentos de Fc. Se conocen numerosas secuencias en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991, cuyas partes se refieren a las secuencias y estructura terciaria de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Kabat *et al.* proporciona alineaciones de numerosas secuencias. Dadas las alineaciones proporcionadas en Kabat *et al.*, la estructura altamente conservada de dominios de inmunoglobulina y las ubicaciones de los bucles proporcionadas en la presente memoria, así como la abundante información adicional disponible en la técnica, podrían ubicarse los bucles en un fragmento de Fc de cualquier isotipo de cualquier especie. Por ejemplo, el ciber sitio del Protein Data Bank contiene abundante información sobre estructuras terciarias de muchas proteínas. En algunos aspectos, los aminoácidos insertados pueden reemplazar de uno a diez aminoácidos que existen de forma natural en el bucle. Los aminoácidos insertados pueden ser de menor, mayor o igual número que los aminoácidos que se retiran. En determinadas realizaciones, todos los aminoácidos originalmente en el bucle permanecen, y los aminoácidos insertados simplemente se añaden. En algunos aspectos, un fragmento de Fc de IgG humana variante puede comprender otras "modificaciones mínimas adicionales", es decir, la inserción, eliminación o sustitución de no más de dieciséis aminoácidos en ubicaciones distintas del bucle en que se produce la inserción. En algunos aspectos, puede haber no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 inserciones, eliminaciones o sustituciones de un único aminoácido en ubicaciones distintas del bucle en que se produce la inserción. En otras realizaciones, un fragmento de Fc variante no comprende ninguna modificación mínima adicional. En algunos aspectos, las modificaciones mínimas adicionales pueden ser, por ejemplo, las "alteraciones de heterodimerización" descritas a continuación, que facilitan la formación de regiones Fc heterodiméricas. En algunos aspectos, estas modificaciones mínimas adicionales pueden incluir sustituciones de aminoácido conservativas.

Las sustituciones de aminoácido conservativas incluyen las siguientes: (1) valina, leucina, o isoleucina por alanina; (2) lisina, glutamina o asparagina por arginina; (3) glutamina, glutamato o aspartato por asparagina; (4) glutamato, asparagina o glutamina por aspartato; (5) serina o alanina por cisteína; (6) asparagina, glutamato o aspartato por glutamina; (7) aspartato, glutamina o asparagina por glutamato; (8) prolina o alanina por glicina; (9) asparagina, glutamina, lisina o arginina por histidina; (10) leucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina por isoleucina; (11) isoleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina por leucina; (12) arginina, asparagina o glutamina por lisina; (13) leucina, fenilalanina o isoleucina por metionina; (14) leucina, valina, isoleucina, alanina o tirosina por fenilalanina; (15) alanina por prolina; (16) treonina, alanina o cisteína por serina; (17) serina por treonina; (18) tirosina o fenilalanina por triptófano; (19) triptófano, fenilalanina, treonina o serina por tirosina; y (20) isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina o alanina por valina.

Además, en algunos aspectos, un fragmento de Fc variante puede contener un "resto farmacológicamente activo" adicional, que es un resto orgánico no peptídico (es decir, "molécula pequeña") o un péptido, que puede actuar como toxina y/o puede imitar, antagonizar o agonizar la actividad de una ruta biológica, conjugado covalentemente o fusionado al fragmento de Fc. Si un fragmento de Fc variante contiene dicho resto farmacológicamente activo, entonces su "fragmento de Fc de control" también contiene dicho resto.

En otros aspectos, el fragmento de Fc de IgG humana variante no comprende ninguna alteración fuera de las que se producen en el bucle en que se produce la inserción. Como un "fragmento de Fc", un "fragmento de Fc variante" puede ser del isotipo IgG, incluyendo los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o del isotipo IgM, IgE, IgD o IgA. Puede ser de origen humano o animal. Por ejemplo, un fragmento de Fc puede ser de un mamífero, tal como un ratón, rato, hámster, conejo, cabra u oveja, o de una especie de camélido o puede modificarse un tiburón para que produzca un fragmento de Fc variante. Como con otros fragmentos de Fc, un fragmento de Fc variante normalmente es dimérico, y una "**región Fc variante**" se define específicamente por como un fragmento de Fc variante dimérico.

Un "**polipéptido Fc variante**", como se entiende en la presente memoria, comprende un fragmento de Fc variante y una región de unión. Opcionalmente, un polipéptido Fc variante puede contener múltiples regiones de unión. Un polipéptido Fc variante puede ser un multímero, tal como un dímero, trímero, tetrámero o multímero de orden superior. En muchos casos, la parte del fragmento de Fc variante del polipéptido Fc puede formar enlaces disulfuro para dimerizar. Los polipéptidos Fc variantes incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de Fc diméricas, anticuerpos de longitud completa tetraméricos (que contienen dos cadenas pesadas y dos ligeras), scFv-Fc diméricos, etc. Pueden ser heteromultímeros u homomultímeros, tales como heterodímeros u homodímeros. Un polipéptido Fc variante puede ser un anticuerpo, una proteína de fusión de Fc o, en algunas realizaciones, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc que comprende un resto farmacológicamente activo adicional que no es de anticuerpo. Dicho "resto farmacológicamente activo" puede conjugarse covalentemente o fusionarse al polipéptido Fc y puede ser un resto orgánico no peptídico (es decir, "molécula pequeña") o un péptido, que puede actuar como toxina o puede imitar, antagonizar o agonizar la actividad de una ruta biológica.

Una "**proteína de fusión de Fc**", como se entiende en la presente memoria, es una proteína que contiene un fragmento de Fc fusionado a otro polipéptido que no es de anticuerpo. El polipéptido que no es de anticuerpo comprende una región de unión que se une a una molécula diana y no comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo. La región de unión de una proteína de fusión de Fc puede comprender un polipéptido que no es de anticuerpo tal como una parte soluble de un receptor o uno o más péptidos que se unen a una molécula diana (tal como, por ejemplo, un "dominio monomérico", como se define en la patente de Estados Unidos 7820790 que se une a una proteína diana, que puede seleccionarse como se analiza en la patente de Estados Unidos 7820790) u otros polipéptidos. Partes de la patente de Estados Unidos 7.820.790 describen dominios monoméricos y la manera en que se seleccionan. En aspectos específicos, una proteína de fusión de Fc puede ser etanercept (ENBREL® vendido por Amgen Inc.), romiplostim (NPLATE® vendido por Amgen Inc.), alefacept (AMEVIVE®, Biogen Corp.), abatacept (ORENCIA® vendido por Bristol -Myers Squibb), rilonacept (ARCALYST®, vendido por Regeneron) o aflibercept (EYLEA™, vendido por Regeneron). Otros polipéptidos que pueden ser parte de una región de unión de una proteína de fusión de Fc incluyen polipéptidos que comprenden dominios de armazón que se han aleatorizado en determinadas posiciones y sometidos a selección para la unión a una determinada molécula diana. Dichos dominios de armazón incluyen, por ejemplo, proteína 4 asociada a linfocitos T (CTLA-4; Nuttall *et al.* (1999), *Proteins* 36: 217-227), el dominio Z de la proteína 1 de estafilococos (Nord *et al.* (1995), *Protein Eng.* 8: 601-608), proteína fluorescente verde y el décimo dominio de tipo III de fibronectina humana (FN3; Koide *et al.* (1998), *J. Mol. Biol.* 284: 1141-1151; Karatan *et al.* (2004), *Chem. & Biol.* 11: 835-844). Partes de estas referencias describen los dominios de armazón y su uso para generar dominios de unión. Las proteínas de fusión de Fc, como otras proteínas que contienen fragmentos de Fc pueden formar multímeros, que pueden ser dímeros. Estos multímeros pueden ser heteromultímeros u homomultímeros. Una proteína de fusión de Fc puede ser heterodimérica u homodimérica y biespecífica o monoespecífica.

Una "**proteína de fusión de Fc variante**", como se entiende en la presente memoria, es una proteína de fusión de Fc que incluye un fragmento de Fc variante.

Una "**proteína de fusión de Fc de control**", como se entiende en la presente memoria, es una proteína de fusión de Fc que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína de fusión de Fc variante con la que se está comparando excepto por la inserción en el bucle de la parte de fragmento de Fc de la proteína de fusión de Fc variante.

Un "**anticuerpo IgG de longitud completa**", como se entiende en la presente memoria, es un anticuerpo IgG que comprende dos cadenas pesadas completas y dos cadenas ligeras completas.

Las "**alteraciones de heterodimerización**" en general se refieren a alteraciones en las dos cadenas, es decir, las cadenas A y B, de una región Fc dimérica que facilitan la formación de regiones Fc heterodiméricas, es decir, regiones Fc en que la cadena A y la cadena B de la región Fc no tienen secuencias de aminoácidos idénticas. Las alteraciones de heterodimerización pueden ser asimétricas, es decir, una cadena A que tiene una determinada alteración puede emparejarse con una cadena B que tiene una diferente alteración. Estas alteraciones facilitan la heterodimerización y desfavorecen la homodimerización. Que se hayan formado hetero- u homodímeros se puede evaluar por las diferencias de tamaño determinadas por electroforesis en gel de poliácridamida en situaciones donde una cadena polipeptídica es un fragmento de Fc (es decir, que carece de secuencias distintas de las regiones de bisagra C_H2 y C_H3) y el otro es un scFv-Fc. Un ejemplo de dichas alteraciones de heterodimerización emparejadas son las llamadas sustituciones de "botones y ojales". Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.695.936 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0078385, cuyas partes describen dichas mutaciones. Como se entiende en la presente memoria, una región Fc que contiene una pareja de sustituciones de botones y ojales, contiene una sustitución en un fragmento de Fc (denominado la cadena A) y otra en el fragmento de Fc (denominado la cadena B). Por ejemplo, se ha descubierto que las siguientes sustituciones de botones y ojales en las cadenas A y B de una región Fc de IgG1 aumentan la formación de heterodímeros en comparación con las encontradas con cadenas A y B sin modificar: 1) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 2) Y407A en una cadena y T366W en la otra; 3) F405A en una cadena y T394W en la otra; 4) F405W en una cadena y T394S en la otra; 5) Y407T en una cadena y T366Y en la otra; 6) T366Y y F405A en una cadena y T394W e Y407T en la otra; 7) T366W y F405W en una cadena y T394S e Y407A en la otra; 8) F405W e Y407A en una cadena y T366W y T394S en la otra; y 9) T366W en un polipéptido de Fc y T366S, L368A e Y407V en el otro. Como se entiende en la presente

memoria, las mutaciones se indican de la siguiente manera. El aminoácido (usando el código de una letra) normalmente presente en una posición dada en el fragmento Fc usando el sistema de numeración EU (véase la tabla 1 a continuación) va seguido por la posición EU, que va seguido por el aminoácido alternativo que está presente en esa posición. Por ejemplo, Y407T significa que la tirosina normalmente presente en la posición EU 407 está remplazada por una treonina. Como alternativa o además de dichas alteraciones, sustituciones que crean nuevos puentes disulfuro pueden facilitar la formación de heterodímeros. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0078385, cuyas partes describen dichas mutaciones. Dichas alteraciones en una región Fc de IgG1 incluyen, por ejemplo, las siguientes sustituciones: Y349C en un fragmento de FC y S354C en el otro; Y349C en un fragmento de Fc y E356C en el otro; Y349C en un fragmento de Fc y E357C en el otro; L351C en un fragmento de Fc y S354C en el otro; T394C en un fragmento de Fc y E397C en el otro; o D399C en un fragmento de Fc y K392C en el otro. Asimismo, a sustituciones que cambian la carga de uno o más restos, por ejemplo, en la superficie de contacto $\text{CH}_3\text{-CH}_3$, pueden potenciar la formación de heterodímeros como se explica en la publicación internacional WO 2009/089004, cuyas partes describen dichas sustituciones. Dichas sustituciones se mencionan en la presente memoria como "sustituciones de pareja de carga" y una región Fc que contenga un par de sustituciones de pareja de carga contiene una sustitución en la cadena A y una sustitución diferente en la cadena B. Ejemplos generales de sustituciones de pareja de carga incluyen los siguientes: 1) K409D o K409E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 2) K392D o K392E en una cadena más D399K o D399R en la otra; 3) K439D o K439E en una cadena más D356K o D356R en la otra; y 4) K370D o K370E en una cadena más E357K o E357R en la otra. Además, las sustituciones R355D, R355E, K360D o K360R en ambas cadenas pueden estabilizar los heterodímeros cuando se usan con otras alteraciones de heterodimerización. Pueden usarse sustituciones de pareja de carga específicas en solitario o con otras sustituciones de pareja de carga. Ejemplos específicos de pares individuales de sustituciones de pareja de carga y combinaciones de las mismas incluyen las siguientes: 1) K409E en una cadena más D399K en la otra; 2) K409E en una cadena más D399R en la otra; 3) K409D en una cadena más D399K en la otra; 4) K409D en una cadena más D399R en la otra; 5) K392E en una cadena más D399R en la otra; 6) K392E en una cadena más D399K en la otra; 7) K392D en una cadena más D399R en la otra; 8) K392D en una cadena más D399K en la otra; 9) K409D y K360D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 10) K409D y K370D en una cadena más D399K y E357K en la otra; 11) K409D y K392D en una cadena más D399K, E356K y E357K en la otra; 12) K409D y K392D en una cadena y D399K en la otra; 13) K409D y K392D en una cadena más D399K y E356K en la otra; 14) K409D y K392D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 15) K409D y K370D en una cadena más D399K y D357K en la otra; 16) D399K en una cadena más K409D y K360D en la otra; y 17) K409D y K439D en una cadena más D399K y E356K en la otra. Cualquiera de estas alteraciones de heterodimerización puede ser parte de una región Fc variante como se describe en la presente memoria, que puede unirse a FcRn con una mayor afinidad de lo que lo hace una región Fc de control.

Un "**bucle**", como se entiende en la presente memoria es una parte de una estructura terciaria en un fragmento de Fc que se une a hebras beta que componen las láminas beta del plegamiento de inmunoglobulina central. Un bucle puede contener no más de dos restos consecutivos denominados como implicados en una lámina beta (como en los bucles 10 y 11; véase la tabla 1 a continuación) y también puede contener restos denominados como una hélice, un giro, un puente β aislado o un codo. Las regiones de bucle de las regiones Fc de IgG humana, como se entiende en la presente memoria, se muestran en la tabla 1.

Una "**inserción dentro de un bucle**" o "**dentro de**" cualquier tramo de aminoácidos, por ejemplo, una inserción dentro del bucle 10, es una inserción de 3-35, 3-20, 6-20, 6-15, 6-12, 3-15, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos entre dos aminoácidos adyacentes dentro de un bucle o entre un aminoácido dentro de un bucle y un aminoácido adyacente que no es parte del bucle. Una "inserción dentro de un bucle" también abarca situaciones donde se retiran aminoácidos de un bucle, y se insertan otros aminoácidos en el bucle. El número de aminoácidos insertados en el bucle puede ser de 3-35, 3-22, 4-20, 6-18, 6-15, 6-12, 3-15, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos, y el número de aminoácidos retirados del bucle puede ser de menos de, igual a o más del número de aminoácidos insertados en el bucle. Por ejemplo, pueden retirarse 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del bucle. Además, una "inserción dentro de un bucle" abarca aspectos en que se produce más de una inserción dentro del mismo bucle, tal como inserciones entre dos pares diferentes de aminoácidos que están dentro de o adyacentes a un bucle, como se describe anteriormente, o donde uno o más aminoácidos no adyacentes dentro de un bucle se eliminan y se remplazan con menos aminoácidos, el mismo número o más aminoácidos de los que se eliminaron. La colección L3 (como se muestra en la figura 2) es un ejemplo de dicho esquema de inserción.

Una "**inserción dentro de o adyacente a un bucle**", es como una "inserción dentro de un bucle", como se describe anteriormente excepto en que también incluye situaciones donde la inserción es entre un primer aminoácido que está adyacente al bucle y otro aminoácido que está adyacente a este primer aminoácido y está fuera del bucle.

Un "**pH fisiológico**", como se entiende en la presente memoria, es un pH de aproximadamente 7,2-7,6.

Un "**scFv-Fc/Fc**" es una proteína dimérica que consiste esencialmente en un scFv-Fc más un fragmento de Fc que están unidos por uno o más enlaces disulfuro. Además, la región Fc formada por el fragmento de Fc y scFv-Fc pueden contener "alteraciones de heterodimerización" en los dominios CH_3 , tales como dos, tres o más pares de sustituciones de pareja de carga, como se describe.

Un "**péptido**", como se entiende en la presente memoria, es un polipéptido corto. En general, un péptido es de 2 a 80, de 2 a 60, de 2 a 50, de 2 a 40, de 2 a 30 o 2-20 aminoácidos de longitud.

Una "**molécula diana**", como se entiende en la presente memoria, es una molécula a la que se une la región de unión de un polipéptido Fc, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, una molécula diana es, por ejemplo, una proteína que se expresa a altos niveles en una célula cancerosa o se expresa en una célula que media una afección autoinmunitaria o inflamatoria o en una célula infectada, en un agente infeccioso o en una célula que media una función efectora inmunitaria, por ejemplo, una célula NK.

Una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" de un polipéptido Fc variante que tiene mayor afinidad por FcRn que un polipéptido Fc de control, como se describe en la presente memoria, es una cantidad que tiene el efecto de, por ejemplo, reducir o eliminar la carga tumoral de un paciente con cáncer o reducir o eliminar los síntomas de cualquier estado patológico para cuyo tratamiento se usa la proteína. Una cantidad terapéuticamente eficaz no tiene que eliminar completamente todos los síntomas de la afección, sino que puede reducir la gravedad de uno o más síntomas o retardar la aparición de síntomas más graves o una enfermedad más grave que puede producirse con alguna frecuencia después de la afección tratada. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que contiene un polipéptido Fc modificado es suficiente para afectar de forma detectable a la expresión de un biomarcador relevante cuando se administra a un paciente que necesita tratamiento *in vivo*.

El "**tratamiento**" de cualquier enfermedad mencionada en la presente memoria abarca un alivio de al menos un síntoma de la enfermedad, una reducción en la gravedad de la enfermedad o el retardo o prevención de la progresión de la enfermedad en síntomas más graves que pueden acompañar, en algunos casos, a la enfermedad o dar lugar a al menos otra enfermedad. El tratamiento no significa necesariamente que la enfermedad se cure totalmente. Un agente terapéutico útil solamente tiene que reducir la gravedad de una enfermedad, reducir la gravedad de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o su tratamiento, o retardar la aparición de síntomas más graves o una enfermedad más grave que puede producirse con alguna frecuencia después de la afección tratada.

Polipéptidos Fc variantes

Se proporcionan polipéptidos Fc variantes que se unen FcRn, con una afinidad y/o actividad de unión a pH de 5,0 a 6,0 que los polipéptidos Fc de control. Dichos polipéptidos Fc variantes, como los polipéptidos Fc de control se unen a FcRn con baja afinidad y/o actividad de unión, si acaso a pH de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,6. Como se describe en la presente memoria, estos polipéptidos Fc variantes pueden (antes de la modificación) ser de origen humano o animal y pueden ser de un isotipo IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El FcRn también puede ser de origen humano o animal. Estos polipéptidos Fc variantes comprenden además una región de unión que puede unirse a una molécula diana, como se describe en la presente memoria, y pueden usarse para tratar una afección que está mediada, al menos en parte, por la molécula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana puede no mediar directamente la afección tratada, sino que la unión a la molécula diana puede servir para ubicar el polipéptido Fc o la molécula o moléculas diana a las que se une. Por ejemplo, un polipéptido Fc biespecífico podría formar puentes con dos tipos celulares diferentes, por ejemplo, una célula cancerosa y una célula del sistema inmunitario, cada una de las cuales expresa una molécula diana en su superficie a la que puede unirse el polipéptido Fc. Los polipéptidos Fc variantes pueden ser anticuerpos o proteínas de fusión de Fc que comprenden un fragmento de Fc variante. Un polipéptido Fc variante podría ser, además, un anticuerpo que contiene una región de unión que no es de anticuerpo adicional. Opcionalmente, un polipéptido Fc variante puede contener un fragmento de Fc variante de IgG humana.

En la tabla 1 a continuación, se alinean las secuencias de aminoácidos de polipéptidos Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana (SEQ ID NO: 1, 3, 5 y 7, respectivamente). Las secuencias se enumeran de acuerdo con el sistema EU de Edelman *et al.* (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 78-85. Como se muestra en la tabla 1, puede usarse un único número para hacer referencia a una posición que es análoga en los cuatro isotipos de IgG humana, aunque un esquema de numeración lineal forzaría a nombrar un número diferente para esta posición en cada isotipo. Por ejemplo, la asparagina en la posición 297 es un sitio de glucosilación bien conocido y altamente conservado presente en todos los anticuerpos IgG humanos que se conoce como asparagina 297, independientemente del isotipo de IgG humana en análisis.

Los anticuerpos IgG3 humanos tienen una región de bisagra mucho más larga que otros isotipos de IgG humana, y únicamente la parte más carboxiterminal en esta región de bisagra se muestra en la tabla 1. Las secuencias de IgG1, IgG2 e IgG4 humana mostradas en la tabla 1 incluyen la región de bisagra completa. Como es evidente en la tabla 1, la región de bisagra de un anticuerpo IgG4 humano es tres aminoácidos más corta que la de un anticuerpo IgG1. Los anticuerpos IgG2 humanos tienen una región de bisagra ligeramente más corta y un hueco de un aminoácido cerca del extremo aminoterminal de la región CH2 en comparación con IgG1 humana. Los aminoácidos 216-447 mostrados en la línea de IgG1 y los aminoácidos 224-447 en la línea de IgG4 de la tabla 1 corresponden a los aminoácidos 1-232 de la SEQ ID NO: 1 y 6-229 de la SEQ ID NO: 7, respectivamente. Los aminoácidos 216-447 en la línea de IgG3 de la tabla 1, corresponden a los aminoácidos 48-279 de la SEQ ID NO: 5. Los aminoácidos 237 a 447 en la línea de IgG2 de la tabla 1 corresponden a los aminoácidos 18 a 228 de la SEQ ID NO: 3.

En la tabla 1, los aminoácidos que están ubicados en los bucles, como se entiende en la presente memoria, se muestran en **negrita** y están **subrayados**. Cada bucle se marca con un número, es decir, "bucle 1", "bucle 2", etc., por debajo del mismo. En más detalle, se producen bucles en las siguientes ubicaciones: bucle 1, aminoácidos 29-43 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 25-39 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 76-90 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 26-40 de la SEQ ID NO: 7; bucle 2, aminoácidos 50-58 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 46-54 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 97-105 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 47-55 de la SEQ ID NO: 7; bucle 3, aminoácidos 70-72 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 66-68 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 117-119 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 67-69 de la SEQ ID NO: 7; bucle 4, aminoácidos 80-84 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 76-80 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 127-131 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 77-81 de la SEQ ID NO: 7; bucle 5, aminoácidos 92-103 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 88-99 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 139-150 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 89-100 de la SEQ ID NO: 7; bucle 6, aminoácidos 110-116 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 106-112 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 157-163 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 107-113 de la SEQ ID NO: 7; bucle 7, aminoácidos 122-131 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 118-127 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 169-178 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 119-128 de la SEQ ID NO: 7; bucle 8, aminoácidos 137-146 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 133-142 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 184-193 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 134-143 de la SEQ ID NO: 7; bucle 9, aminoácidos 158-162 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 154-158 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 205-209 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 155-159 de la SEQ ID NO: 7; bucle 10, aminoácidos 169-175 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 216-222 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 166-172 de la SEQ ID NO: 7; bucle 11, aminoácidos 179-188 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 175-184 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 226-235 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 176-185 de la SEQ ID NO: 7; bucle 12, aminoácidos 199-207 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 195-203 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 246-254 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 196-204 de la SEQ ID NO: 7; bucle 13, aminoácidos 214-221 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 210-217 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 261-268 de la SEQ ID NO: 5, y aminoácidos 211-218 de la SEQ ID NO: 7

Tabla 1: Alineación de regiones Fc de IgG humana (la alineación divulga las SEQ ID NO: 1 y 3, los restos 48-279 de la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7, respectivamente, en orden de aparición)

	225	235	245	255	265	275
	*	*	*	*	*	*
IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF	<u>PPKPKDTLMISRTPE</u>	VTCVVV	<u>DVSHEDPEV</u>	KF	
IgG2	ERKCCVE---CPPCPAPPVA-GPSVFLF	<u>PPKPKDTLMISRTPE</u>	VTCVVV	<u>DVSHEDPEV</u>	QF	
IgG3	EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLF	<u>PPKPKDTLMISRTPE</u>	VTCVVV	<u>DVSHEDPEV</u>	QF	
IgG4	ESKYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLF	<u>PPKPKDTLMISRTPE</u>	VTCVVV	<u>DVSOEDPEV</u>	QF	
DSSP	S SS S S	SSS EEEEE	HHHHH TTS	EEEEEE	TT	EE
			Bucle 1		Bucle 2	
	285	295	305	315	325	335
	*	*	*	*	*	*
IgG1	NWYVDGVEV <u>HNA</u> AKTKPRE <u>QYN</u> STYRVVSVL <u>TVLHODWLN</u> GKEYCKVSN <u>KALPAP</u> IEKT					
IgG2	NWYVDGMEV <u>HNA</u> AKTKPRE <u>QFN</u> STFRVVS <u>TVVHODWLN</u> GKEYCKVSN <u>KGLPAP</u> IEKT					
IgG3	KWYVDGVEV <u>HNA</u> AKTKPRE <u>QYN</u> STFRVVS <u>TVLHODWLN</u> GKEYCKVSN <u>KALPAP</u> IEKT					
IgG4	NWYVDGVEV <u>HNA</u> AKTKPRE <u>QFN</u> STYRVVSVL <u>TVLHODWLN</u> GKEYCKVSN <u>KGLPSS</u> IEKT					
DSSP	EEEEETEEE	EEEEEE TTS	EEEEEE	HHHHHT	EEEEEE TTSS	EEEE
	Bucle 3	Bucle 4	Bucle 5		Bucle 6	
	345	355	365	375	385	395
	*	*	*	*	*	*
IgG1	<u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN</u> QVSLTCLVKGF <u>YPSDI</u> AVEWES <u>NGOPENNYKTTP</u>					
IgG2	<u>ISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> QVSLTCLVKGF <u>YPSDI</u> AVEWES <u>NGOPENNYKTTP</u>					
IgG3	<u>ISKTGQPREPQVYTLPPSREEMTKN</u> QVSLTCLVKGF <u>YPSDI</u> AVEWES <u>SGOPENNYNTTP</u>					
IgG4	<u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN</u> QVSLTCLVKGF <u>YPSDI</u> AVEWES <u>NGOPENNYKTTP</u>					
DSSP	E B EEEEE	GGGGSS	EEEEEEEEEEEBSS	EEEEETTEE	EEE	
	Bucle 7	Bucle 8	Bucle 9	Bucle 10		
	405	415	425	435	445	
	*	*	*	*	*	
IgG1	<u>PVLDS</u> DG <u>SFF</u> LYSKLTVD <u>KSRW</u> QOGNVFSCSV <u>MHEALHNHY</u> TQKSLSLSPGK					
IgG2	<u>PMLDS</u> DG <u>SFF</u> LYSKLTVD <u>KSRW</u> QOGNVFSCSV <u>MHEALHNHY</u> TQKSLSLSPGK					
IgG3	<u>PMLDS</u> DG <u>SFF</u> LYSKLTVD <u>KSRW</u> QOGNI <u>FSCSV</u> <u>MHEALHNRF</u> TQKSLSLSPGK					
IgG4	<u>PVLDS</u> DG <u>SFF</u> LYSRLTVD <u>KSRW</u> QEGNVFSCSV <u>MHEALHNHY</u> TQKSLSLSLGK					
DSSP	EE TTS	EEEEEEEEHHHHHT	EEEEEE	TTSGGG	EEEE	S
	Bucle 11	Bucle 12	Bucle 13			

Las marcas en la quinta línea de cada grupo alineado, denominada "DSSP" (que significa Dictionary of Protein Secondary Structure) se obtuvieron de la estructura 1HZH (cadena H) disponible en el Protein Data Bank, y tienen

los siguientes significados: "G" indica una hélice de 3 giros (hélice 3_{10}), que tiene una longitud mínima de 3 restos; "H" indica una hélice de 4 giros (hélice α), que tiene una longitud mínima de 4 restos; "I" indica una hélice de 5 giros (hélice π), que tiene una longitud mínima de 5 restos; "T" indica un giro con enlace de hidrógeno (giro 3, 4 o 5); "E" indica una hebra prolongada en conformación de lámina β paralela y/o antiparalela, que tiene una longitud mínima de 2 restos; "B" indica un resto en un puente β aislado (formación de un único par de enlaces de hidrógeno de lámina β); "S" indica un codo (la única asignación basada en enlaces que no son de hidrógeno). A los restos de aminoácido que no están en ninguna de las conformaciones anteriores se le asigna un espacio en blanco en la línea "DSSP". Estas denominaciones son convencionales en la técnica y están disponibles en la página web del Protein Data Bank (PDB).

La región de bisagra de dos fragmentos de Fc de IgG humana van desde el aminoácido 216 hasta el 230 numerados en la tabla 1. La región C_H2 se prolonga desde el aminoácido 231 hasta el 340 y la región C_H3 se prolonga desde el aminoácido 341 hasta el 447. Es evidente a partir de la alineación de la tabla 1 que las secuencias de los fragmentos de Fc de IgG humana están muy conservadas. La mayoría de las diferencias de secuencia se producen en la región de bisagra, y se producen muy pocas diferencias de secuencia en las regiones C_H2 y C_H3 . Por tanto, los resultados obtenidos usando los polipéptidos Fc variantes que comprenden un fragmento de Fc variante de IgG humana que comprenden inserciones en la región C_H2 o C_H3 de un subtipo de IgG humana probablemente serán aplicables a otros subtipos de IgG humana.

Las inserciones en los polipéptidos Fc de IgG humana variantes descritos en la presente memoria pueden producirse en ubicaciones que se sabe que están en los bucles. Las inserciones pueden producirse dentro de o adyacentes a cualquiera de los bucles 1-13 (como se muestra en la tabla 1 anterior) de una parte de fragmento de Fc del polipéptido Fc. En algunos aspectos, pueden hacerse inserciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 o 1-18, 6-16, 10-16, 12-14, 3-20, 20-30, 30-50 o 50-80 aminoácidos entre dos aminoácidos adyacentes, al menos uno de los cuales se incluye en un bucle de un fragmento de Fc. Dos cisteínas pueden incluirse de forma no aleatoria en la inserción, cada una entre los cuatro primeros y últimos aminoácidos de la inserción, para restringir los aminoácidos entre las cisteínas en un bucle apretado unido por un enlace disulfuro; los tres primeros aminoácidos de la inserción pueden ser Gly-Gly-Cys y los tres últimos aminoácidos pueden ser Cys-Gly-Gly. Puede insertarse una inserción de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 10-30 aminoácidos adicionales entre estas dos cisteínas. En otros aspectos más, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del bucle se eliminan y rempazan por una inserción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 o 1-18, 6-16, 10-16, 12-14, 15-30, 30-50 o 50-80 aminoácidos y/o por una inserción que contiene dos cisteínas entre los cuatro primeros y últimos aminoácidos de la inserción. El número de aminoácidos eliminados puede ser igual, menor o mayor al número de aminoácidos insertados. En otros aspectos, puede producirse más de una inserción en un único bucle. Los polipéptidos Fc variantes, que contienen las inserciones, pueden unirse a FcRn humano con una afinidad mayor a pH 5 a 6 que el polipéptido Fc de control. Los aminoácidos insertados pueden incluir los 20 aminoácidos o cualquiera de todos los aminoácidos distintos de cisteína. Además, como se describe en la presente memoria, un fragmento de Fc variante puede comprender una inserción en únicamente un bucle o en más de un bucle, tal como en 2, 3 o 4 bucles.

Las inserciones dentro de o adyacentes a los bucles 5, 8 o 10 de un fragmento de Fc pueden aumentar la afinidad de unión de dicho fragmento de Fc variante por FcRn humano a pH 5 a 6. En aspectos específicos, puede hacerse una inserción en un fragmento de Fc de IgG humana dentro de o adyacente al bucle 8 entre los aminoácidos 358 y 359 o, en determinadas realizaciones, dentro de o adyacentes al bucle 10 entre los aminoácidos 384 y 385 (usando el esquema de numeración EU como se ilustra en la tabla 1). La inserción, como se divulga y/o reivindica en la presente memoria, puede contener de 4-20, 1-18, 6-16, 10-16, 12-14, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos. Opcionalmente, los aminoácidos pueden limitarse a todos los aminoácidos distintos de cisteína. En algunas realizaciones, la inserción puede contener una cisteína entre los cuatro primeros y últimos aminoácidos de la inserción. Y los aminoácidos insertados pueden limitarse de otro modo a aminoácidos distintos de cisteína. En algunas realizaciones, la inserción puede no contener cisteínas. En algunas realizaciones, la inserción puede tener una fórmula seleccionada del grupo que consiste en CXXXXXXC (SEQ ID NO: 13), CXXXXXXXC (SEQ ID NO: 14), CXXXXXXXXC (SEQ ID NO: 15), GCXXXXXXC (SEQ ID NO: 16), GCXXXXXXXC (SEQ ID NO: 17), GCXXXXXXXXC (SEQ ID NO: 18), GGCXXXXXXC (SEQ ID NO: 19), GGCXXXXXXXC (SEQ ID NO: 20), y GGCXXXXXXXXC (SEQ ID NO: 21), GGCXXXXXXXC (SEQ ID NO: 22), GGCXXXXXXXXC (SEQ ID NO: 23) y GGCXXXXXXXXC (SEQ ID NO: 24), donde X representa cualquier aminoácido excepto cisteína. Como la inserción real es el resultado de un proceso de cribado como se describe en los ejemplos a continuación, son los aminoácidos aleatorizados los que probablemente desempeñan una función dominante en los cambios observados en las propiedades del fragmento de Fc. Por tanto, se contempla que un fragmento de Fc variante que tenga una inserción que contenga únicamente las posiciones aleatorizadas de inserciones que, como las anteriores, contienen algunos aminoácidos no aleatorios, pueda tener también las propiedades deseadas. Ejemplos de dicha secuencia incluyen los seis aminoácidos centrales de la SEQ ID NO: 41-53, que se muestran como la SEQ ID NO: 54-66.

En otro aspecto, los aminoácidos 308 y 309 (usando la numeración EU como se muestra en la tabla 1) dentro de o adyacentes al bucle 5 se eliminan y rempazan de 4-20, 1-18, 6-16, 10-16, 12-14, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 15-20, 20-40, 40-60 o 60-80 aminoácidos, que pueden estar limitados a todos los aminoácidos distintos de cisteína. En algunos aspectos, la inserción puede contener una cisteína entre los cuatro primeros y últimos aminoácidos de la inserción, y los aminoácidos insertados pueden limitarse de otro modo a aminoácidos

distintos de cisteína. La inserción puede tener una fórmula seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13-24.

Estos fragmentos de Fc variantes, así como los polipéptidos Fc que los contienen, que comprenden las inserciones de aminoácidos descritas anteriormente y a continuación, pueden unirse a FcRn humano a pH 5 a 6 con mayor afinidad y/o actividad de unión en comparación con un fragmento de Fc de control y pueden unirse a FcRn humano a pH fisiológico con una afinidad y/o actividad de unión comparable a o inferior a la de fragmentos de Fc de control. Además, estos fragmentos de Fc variantes pueden alterarse adicionalmente y cribarse para alteraciones que confieren afinidad y/o actividad de unión incluso mayor por FcRn humano a pH 5 a 6, afinidad y/o actividad de unión inferior por FcRn humano a pH fisiológico u otras propiedades deseables, tales como estabilidad en almacenamiento. En los ejemplos siguientes, se muestran inserciones de secuencias de aminoácidos particulares (por ejemplo, SEQ ID NO: 41-66 y 90-246) en sitios definidos dentro de un fragmento de Fc que son eficaces en aumentar la afinidad y/o actividad de unión del fragmento de Fc por FcRn humano a pH 5 a 6.

Los polipéptidos Fc variantes que comprenden los fragmentos de Fc variante de IgG humana también comprenden una región de unión que se une a una molécula diana. La unión de dichos polipéptidos Fc variantes a la molécula diana puede modular, opcionalmente antagonizar o agonizar, la actividad biológica de la molécula diana y/o puede servir para ubicar el polipéptido Fc en una ubicación donde se expresa la molécula diana. Un polipéptido Fc puede incluir más de una región de unión, tal como dos, tres o cuatro regiones de unión en un polipéptido Fc. Como un polipéptido Fc puede multimerizar formando, en algunos casos, dímeros, trímeros o tetrameros, la multimerización de diferentes polipéptidos Fc puede formar polipéptidos Fc multiméricos que pueden unirse a más de una molécula diana. Si hay múltiples regiones de unión en un polipéptido Fc, pueden unirse a las mismas o diferentes moléculas diana o partes de una molécula diana. La modulación de la actividad de la molécula diana puede afectar a la evolución de una enfermedad o afección que está mediada al menos en parte por la molécula diana. Los polipéptidos Fc variantes de IgG humana pueden comprender una región de unión que incluye una o más regiones variables de anticuerpo que se unen a una o más moléculas diana. Dichos polipéptidos Fc variantes de IgG humana pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa tales como anticuerpos IgG humanos, humanizados o quiméricos, scFc-Fv, formas monovalentes de anticuerpos tales como las descritas en la publicación de solicitud internación WO 2005/063816 y la publicación de solicitud de Estados Unidos 2007/0105199, que comprenden una región Fc dimérica, así como las regiones V_H, C_H1, V_L, C_L y de bisagra. Se describen formas adicionales, por ejemplo, en la figura 2 de la publicación de solicitud de Estados Unidos 2010/0286374, junto con el texto que describe y/o se refiere a la figura 2, y en la patente de Estados Unidos 5.837.821, que describe "minicuerpos" que comprenden una scFv unido a una región Fc. Como alternativa, la región de unión puede comprender la totalidad o parte de una proteína que no es de anticuerpo, opcionalmente una proteína humana, que se une a la molécula diana. Por ejemplo, la región de unión podría comprender una parte extracelular de un receptor tal como, por ejemplo, la región extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral p75 humano (SEQ ID NO: 13) o la proteína 4 asociada a linfocitos T humana (CTLA4) (SEQ ID NO: 14).

La región de unión puede comprender uno o más péptidos que se unen a una molécula diana (tal como, por ejemplo, un "dominio monomérico", como se define en la patente de Estados Unidos 7.820.790 que se une a una proteína diana, que puede seleccionarse como se analiza en la patente de Estados Unidos 7.820.790) u otros péptidos. Partes de la patente de Estados Unidos 7.820.790 describen dominios monoméricos y la manera en que se seleccionan. Un ejemplo de dicho péptido es la parte de unión de la proteína de fusión de Fc romiplostim (NPLATE®, Amgen Inc., Thousand Oaks, California). Ficha técnica, NPLATE®, Amgen Inc., 2008-2011. Otros polipéptidos que pueden ser parte de una región de unión de una proteína de fusión de Fc incluyen polipéptidos que comprenden dominios de armazón que se han aleatorizado en determinadas posiciones y se han sometido a selección para la unión a una determinada molécula diana. Dichos dominios de armazón incluyen, por ejemplo, CTLA-4 (Nuttall *et al.* (1999), *Proteins* 36: 217-227), el dominio Z de la proteína 1 de estafilococos (Nord *et al.* (1995), *Protein Eng.* 8: 601-608), proteína fluorescente verde y el décimo dominio de tipo III de fibronectina humana (FN3; Koide *et al.* (1998), *J. Mol. Biol.* 284: 1141-1151; Karatan *et al.* (2004), *Chem. & Biol.* 11: 835-844). Partes de estas referencias describen los dominios de armazón y su uso para generar dominios de unión.

Una molécula diana, a la que se une una región de unión, puede ser una molécula donde la modulación de la actividad biológica de la molécula puede afectar a la evolución de una enfermedad o afección o puede ser una molécula ubicada en una zona enferma, por ejemplo, una proteína expresada en la superficie de células cancerosas. En una afección autoinmunitaria o inflamatoria, la molécula diana puede ser una molécula que actúa en una ruta que desempeña una función en la mediación de la afección. Una molécula diana puede ser una molécula que se ubica de modo que la unión a la molécula diana colocará a un polipéptido Fc apropiadamente de modo que pueda afectar a la evolución de una enfermedad. Por ejemplo, si un polipéptido Fc incluye una toxina, colocarlo cerca de una célula cancerosa mediante una región de unión que se une a una proteína muy expresada en las células cancerosas puede ser ventajoso. Las moléculas diana incluyen, por ejemplo, clases generales de proteínas tales como ligandos solubles, ligandos unidos a receptor, receptores solubles, receptores unidos a membrana, proteínas de canal de membrana, proteínas solubles y unidas a membrana y antígenos no proteínicos, incluyendo moléculas diana extracelulares e intracelulares. Las moléculas diana ejemplares incluyen, sin limitación, las siguientes proteínas humanas: factor de necrosis tumoral, receptor de factor de necrosis tumoral, interleucina 1, interleucina-6 (IL-6), receptor de IL-6, CD80/86, CD20, CD33, CD52, interleucina-12, interleucina-23, interleucina-17, HER2, receptor de HER2 neu, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento del endotelio vascular

(VEGF), factor activador de linfocitos B (BAFF), ligando de RANK, OR51E2, claudinas, CDH3, CD22, factores del complemento y esclerostina, entre muchos otros.

Dependiendo en parte de la célula hospedadora en que se produce un polipéptido Fc variante y/o los métodos de purificación usados, el polipéptido Fc variante puede comprender además secuencias de aminoácidos adicionales tales como, por ejemplo, una secuencia señal que facilita la secreción en células eucariotas (que se elimina en las formas maduras de la proteína), una metionina en el extremo N para facilitar la traducción en bacterias y/o una secuencia de marca (por ejemplo, una marca de polihistidina o una marca FLAG®) para facilitar la purificación o identificación de la proteína.

Colecciones que codifican ácidos nucleicos de fragmentos de Fc variantes

En la presente memoria también se describen colecciones de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc que tienen inserciones, que están al menos parcialmente aleatorizados, que se producen dentro de o adyacentes a bucles de los fragmentos de Fc. La figura 2 ilustra el formato para cada una de las ocho colecciones que se prepararon, como se describe a continuación en los ejemplos. Las secuencias de estas colecciones y las secuencias de aminoácidos codificadas por las mismas se divulgan en las SEQ ID NO: 25-40. Dichas colecciones son útiles para paneo para seleccionar ácidos nucleicos individuales que codifican fragmentos de Fc de IgG humana variantes que se unen con afinidad potenciada a FcRn a pH 5,0 a 6,0 en comparación con un fragmento de Fc de control. Dichos polipéptidos Fc de IgG humana variantes también pueden unirse a FcRn escasamente, si acaso, a pH 7,2 a 7,6, como un fragmento de Fc de control.

En algunos aspectos, estas colecciones de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc con inserciones en regiones que codifican regiones de bucle (como se expone en la tabla 1) pueden ser de origen humano o animal, incluyendo ácidos nucleicos que codifican fragmentos Fc de ratón, rata, conejo o mono o fragmentos de Fc de una especie de camélido. Como se describe en la presente memoria, el fragmento de Fc codificado puede ser un fragmento de Fc de IgG, tal como un fragmento de Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o un fragmento de Fc de un isotipo IgA, IgE, IgD e IgM. Las inserciones en las partes de los ácidos nucleicos que codifican los bucles pueden estar dentro de o adyacentes a las secuencias nucleotídicas que codifican el bucle 1, bucle 2, bucle 3, bucle 4, bucle 5, bucle 6, bucle 7, bucle 8, bucle 9, bucle 10, bucle 11, bucle 12 o bucle 13 como se muestra en la tabla 1.

El tamaño de la colección, en comparación con el número de variantes diferentes en la colección, es una consideración importante. En un mejor caso, el procedimiento de paneo al que se somete la colección tendrá una alta probabilidad de incluir todas las variantes diferentes que se incluyen en la colección. El número de variantes diferentes en la colección depende del número de posiciones aleatorizadas en la colección y el número de aminoácidos diferentes que pueden usarse en cada posición aleatorizada. Por ejemplo, una colección que tiene seis posiciones aleatorizadas que pueden contener cualquiera de 19 aminoácidos diferentes puede tener teóricamente $19^6 \approx 4,7 \times 10^7$ variantes diferentes. Si, por ejemplo, se someten a paneo 10^9 fagos o bacterias independientes que expresan esas variantes, hay una probabilidad muy alta de que se recuperen todos los aislados con las propiedades seleccionadas en el cribado. Véase, por ejemplo, Grossman y Turner, *Mathematics for the Biological Sciences*, Capítulo 2, Sección 2.9, pág. 97-104, Macmillan Publishing Co., Inc., Nueva York y Collier Macmillan Publishers, Londres, 1974. Se contemplan colecciones de un tamaño que hace posible cribar aislados suficientes para detectar aislados infrecuentes con las propiedades deseadas. Por tanto, se contemplan colecciones que codifican de 10^5 a 10^{13} , de 10^6 a 10^{12} o de 10^7 a 10^{10} variantes diferentes.

Pueden ser ventajosas colecciones con inserciones aleatorizadas dentro de o adyacentes a secuencias nucleotídicas que codifican los bucles 5, 8 y 10 de la parte que codifica el fragmento de Fc. Dichas colecciones pueden codificar fragmentos de Fc con inserciones dentro de o adyacentes a los bucles 5, 8 o 10 que contienen 20-40, 4-20, 1-18, 6-16, 10-16, 12-14, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos aleatorizados. Estos aminoácidos aleatorizados pueden estar flanqueados por restos de cisteína. Como se describe en la presente memoria, también pueden insertarse aminoácidos no aleatorizados adicionales antes o después de los aminoácidos aleatorizados; los aminoácidos aleatorizados codificados pueden estar precedidos por Gly-Gly-Cys y seguidos por Cys-Gly-Gly.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos Fc variantes, fragmentos de Fc e inserciones

También se describen ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc variantes específicos, que pueden ser parte de un polipéptido Fc variante, y ácidos nucleicos que codifican inserciones dentro de o adyacentes a bucles de fragmentos de Fc variantes. Las secuencias nucleotídicas que codifican fragmentos de Fc son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991) y secuencias que codifican fragmentos de Fc IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humana (SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, respectivamente) se presentan en la presente memoria. Las ubicaciones de los bucles dentro de los fragmentos de Fc están delimitadas (tabla 1) y en la presente memoria se describen diversos tipos de inserciones en estas regiones. También se presentan secuencias que codifican inserciones de aminoácidos que aumentan la unión a FcRn a pH en el intervalo de 5 a 6 (véanse, por ejemplo, las SEQ ID NO: 41-53).

Más en general, en la presente memoria se describen ácidos nucleicos que codifican un fragmento de Fc variante que tiene una inserción dentro de o adyacente a un bucle, en el que el fragmento de Fc puede unirse a FcRn humano con mayor afinidad a pH 5-6 que un fragmento de Fc de control. Las posiciones en que se producen dichas inserciones incluyen los bucles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 dentro del polipéptido Fc.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos Fc variantes pueden usarse para producir polipéptidos Fc variantes introduciendo los ácidos nucleicos en células hospedadoras, incluyendo células hospedadoras procariotas o eucariotas, y cultivando las células en condiciones de modo que se expresará la una o más proteínas codificadas por los ácidos nucleicos. El polipéptido Fc variante puede recuperarse de la masa celular o el sobrenadante de cultivo. Dichos polipéptidos pueden purificarse por métodos bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba, entre otros métodos disponibles.

Métodos de aislamiento y preparación de fragmentos de Fc y polipéptidos Fc variantes

Los fragmentos de Fc variantes pueden aislarse usando procedimientos de cribado descritos en detalle en los ejemplos a continuación. En términos amplios, se prepara una colección de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc con inserciones que incluyen aminoácidos aleatorizados dentro de o adyacentes a un bucle. Esta colección entonces se introduce en un virus o una célula, que se cultiva en condiciones tales que se puedan expresar los ácidos nucleicos de la colección, de modo que el virus (que puede ser, por ejemplo, un baculovirus o un fago filamentoso) o célula (que puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana, de levadura o de mamífero) pueda presentar los fragmentos de Fc que contienen las inserciones. En un aspecto alternativo, la colección puede traducirse *in vitro* en un sistema de presentación de ribosoma de modo que los fragmentos de Fc con las propiedades deseadas, y los ácidos nucleicos que los codifican puedan seleccionarse de esta mezcla. Como alternativa, puede usarse un sistema de presentación CIS. Véase, por ejemplo, Odegrip *et al.* (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. 101(9): 2806-2810. En los métodos descritos en la presente memoria, los fragmentos de Fc variantes que pueden unirse a FcRn humano con mayor afinidad en comparación con un fragmento de Fc de control dentro del intervalo de pH de 5 a 6 pueden enriquecerse por paneo con FcRn como se describe en los ejemplos a continuación y cribarse para usar, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), que puede realizarse inicialmente en grupos de aislados o en aislados individuales. Si se realiza inicialmente ELISA en grupos de aislados, estos aislados pueden amplificarse y volver a cribarse individualmente para obtener aislados individuales que expresen un fragmento de Fc variante con afinidad potenciada por FcRn humano a pH 5-6 y con afinidad inferior o aproximadamente la misma por FcRn humano a pH fisiológico en comparación con un fragmento de Fc de control.

En etapas adicionales, los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de Fc variantes pueden aislarse de fagos o células, tales como bacterias, células de levadura o mamífero, o amplificarse a partir de ARN en el caso de presentación en ribosoma. Estos ácidos nucleicos pueden secuenciarse para determinar la posición exacta y la naturaleza de la inserción. Usando esta información, pueden construirse ácidos nucleicos que codifican un polipéptido Fc variante o fragmento de Fc variante deseado usando métodos bien conocidos en la técnica. Puede emprenderse modificación adicional del ácido nucleico que codifica el fragmento Fc o polipéptido Fc variante, si se desea.

Dichos ácidos nucleicos pueden insertarse en vectores apropiados para la célula hospedadora en que se expresará el polipéptido Fc o fragmento de Fc. Estos ácidos nucleicos pueden introducirse en las células hospedadoras por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica. Las células hospedadoras que podrían usarse incluyen bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, levaduras, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, células de insecto, células vegetales y células de mamífero, incluyendo células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 y células de riñón de cría de hámster (BHK), entre muchas otras. Estas células hospedadoras pueden cultivarse en condiciones tales que se expresarán los ácidos nucleicos introducidos, y pueda recuperarse el polipéptido Fc o fragmento de Fc del sobrenadante de cultivo o la masa celular.

En general, el procedimiento usado para introducir los ácidos nucleicos en las células hospedadoras puede depender de la célula hospedadora en la que tienen que introducirse los ácidos nucleicos. Los métodos de introducción de ácidos nucleicos en bacterias son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, habitualmente se usa electroporación o transformación con cloruro de calcio. Los métodos para la introducción de ácidos nucleicos en levaduras son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos de transformación usando acetato de litio y polietilenglicol. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, aunque sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del uno o más polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos.

Los vectores de expresión usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias nucleotídicas exógenas. Dichas secuencias típicamente incluirán una o más de las siguientes secuencias nucleotídicas: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de ajuste donador y aceptador, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación,

una región policonectora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento marcador de selección.

Usos terapéuticos de polipéptidos Fc variantes

Los polipéptidos Fc variantes descritos en la presente memoria pueden usarse como agentes terapéuticos para seres humanos para una diversidad de afecciones. Que un polipéptido Fc variante sea apropiado para dicha afección puede determinarse mediante la una o más regiones de unión del polipéptido Fc, así como posiblemente otros aspectos de su estructura tales como, por ejemplo, un resto tóxico adherido. Los polipéptidos Fc variantes pueden haber aumentado las semividas *in vivo* en comparación con los polipéptidos Fc de control y, por lo tanto, pueden requerir dosificaciones inferiores y/o menos frecuentes que los polipéptidos Fc de control. Por tanto, los polipéptidos Fc variantes podrían ser muy adecuados para tratar afecciones crónicas, donde es particularmente deseable una dosificación menos frecuente. Sin embargo, un polipéptido Fc variante puede usarse como tratamiento de la mayoría o todas las afecciones que se pueden tratar usando un polipéptido Fc de control (que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido Fc variante, excepto en que no tiene la inserción en un bucle). Los polipéptidos Fc variantes descritos en la presente memoria también pueden usarse simultáneamente con otras medicaciones usadas para tratar la afección que se está tratando.

Por ejemplo, una proteína de fusión de Fc que es un polipéptido Fc variante que contiene una inserción en un bucle puede usarse como tratamiento para las mismas afecciones que se usa un polipéptido Fc de control. Sin embargo, la cantidad y/o frecuencia de dosificación del polipéptido Fc variante puede ser diferente a causa de su semivida aumentada. Por ejemplo, un polipéptido Fc variante podría prepararse partiendo de una proteína de fusión de Fc terapéutica tal como etanercept (que está indicada para artritis reumatoide de moderada o grave, artritis idiopática juvenil poliarticular, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y psoriasis en placas de moderada a grave), abatacept (que está indicada para artritis reumatoide de moderada a grave, artritis idiopática juvenil poliarticular de moderada a grave) o romiplostim (que está indicada para púrpura trombocitopénica inmunitaria crónica) insertando una de las inserciones que potencian la unión a FcRn divulgada en la presente memoria, por ejemplo, las SEQ ID NO: 41-53, en un bucle en la parte del fragmento de Fc de cada una de estas moléculas. La inserción podría generarse, por ejemplo, dentro de o adyacente a los bucles 5, 8 o 10 de la parte del fragmento de Fc de la proteína de fusión de Fc. Dichas formas variantes de etanercept, abatacept o romiplostim podrían usarse para tratar las mismas enfermedades que pueden tratarse usando etanercept, abatacept o romiplostim inalteradas.

Asimismo, si el polipéptido Fc variante es un anticuerpo terapéutico tal como, por ejemplo, adalimumab, ustikinumab, golimumab, natalizumab, infliximab o denosumab, dicha forma variante del anticuerpo que comprende un fragmento de Fc variante puede usarse para tratar las mismas enfermedades para las que se usan estos anticuerpos, en una forma inalterada, para tratarlas. Por tanto, un fragmento de Fc variante, como se describe en la presente memoria, puede cambiar la cantidad de dosificación o frecuencia del tratamiento, pero no la afección para la que se usa el polipéptido Fc para tratarla.

En general, los polipéptidos Fc se usan para tratar una amplia diversidad de enfermedades incluyendo indicaciones oncológicas, afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, afecciones relacionadas con los huesos, afecciones, afecciones metabólicas y afecciones neurológicas tales como, por ejemplo, dolor crónico, entre muchas otras.

Composiciones farmacéuticas

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los fragmentos de Fc variantes o polipéptidos Fc variantes descritos en la presente memoria. Dichas composiciones pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido Fc variante o fragmento de Fc variante con uno o más componentes adicionales tal como un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable. Dichos componentes adicionales pueden incluir tampones, glúcidos, polioles, aminoácidos, agentes quelantes, estabilizantes y/o conservantes, entre muchas posibilidades.

Métodos de administración

Los polipéptidos Fc variantes o fragmentos de Fc variantes o composiciones farmacéuticas que contienen estas moléculas, pueden administrarse por cualquier método factible. Los agentes terapéuticos que comprenden una proteína se administrarán habitualmente por inyección ya que la administración oral, en ausencia de una formulación o circunstancia especial, daría lugar a hidrólisis de la proteína en el entorno ácido del estómago. La inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarterial, intralesional o peritoneal son vías posibles de administración. La administración tópica también es posible, especialmente para enfermedades que implican la piel. Como alternativa, los polipéptidos Fc variantes o fragmentos de Fc variantes pueden administrarse a través del contacto con una membrana mucosa, por ejemplo, por administración intranasal, sublingual, vaginal o rectal o como un inhalante. Como alternativa, determinadas composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido Fc variante o fragmento de Fc variante pueden administrarse por vía oral.

Habiendo descrito la materia en cuestión que se refiere a la invención en términos generales anteriormente, se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Creación de un modelo de la estructura terciaria de FcRn humano:Fc de IgG1 humana

Par ayudar al diseño de las colecciones descritas a continuación, se creó un modelo de homología de la estructura terciaria de un FcRn humano en un complejo con un fragmento de Fc de IgG1 humana basándose en la estructura de un complejo de un FcRn de ratón y un fragmento de Fc de IgG de rata disponible en Protein Data Bank (número de acceso a PDB 1FRT). Se hizo una búsqueda en Protein Data Bank (PDB) con secuencias de aminoácidos del fragmento de Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 1) y las cadenas de α y β -2-microglobulina (β 2m) de FcRn humano, SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente. Se obtuvieron varios moldes basándose en la homología de secuencia de aminoácidos y la estructura terciaria. Las estructuras de cadena α de FcRn (1EXU (cadena A), 1FRT (cadena A), y 111A (cadena A)), las estructuras de cadena β 2m de FcRn (1CE6 (cadena B), 1HSA (cadena B), 1YPZ (cadena B), 1HHG (cadena B) y 111A (cadena B)), y las estructuras de Fc 1HZH (cadena H), 111A (cadena C), 1OQO (cadena A), 1T83 (cadena A) y 2J6E (cadena A)) se seleccionaron. Las estructuras α de FcRn 1EXU (cadena A), 1FRT (cadena A) y 111A (cadena A) se superpusieron y los valores de la desviación de la media cuadrática resultante (RMSD), es decir, el promedio de la distancia entre átomos análogos en estructuras proteínicas superpuestas, son de 0,30 Å a 0,76 Å, dentro de valor medio de 0,59 Å. Los valores de RMSD entre las estructuras de dominio β 2m de FcRn 1CE6 (cadena B), 1HSA (cadena B), 1YPZ (cadena B), 1HHG (cadena B) y 111A (cadena B) varían de 0,30 Å a 0,76 Å dentro del valor medio de 0,59 Å. Los valores de RMSD entre las estructuras de Fc 1HZH (cadena H), 111A (cadena C), 1OQO (cadena A), 1T83 (cadena A) y 2J6E (cadena A) varían de 0,30 Å a 0,76 Å dentro del valor medio de 0,59 Å. Estos valores de RMSD indican que las estructuras de FcRn y Fc de molde de diferentes fuentes comparten estructuras terciarias muy similares.

Basándose en estas estructuras de molde y las secuencias de aminoácidos de FcRn humano (hFcRn) y el fragmento de Fc de IgG1 humana (Fc hlgG1), se creó un modelo de homología del complejo de hFcRn:Fc hlgG1 usando un módulo de modelado molecular basado en Linux del programa informático Molecular Operating Environment (MOE; Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canadá). La figura 1 muestra la parte de este complejo modelado donde el Fc de hlgG1 (debajo) y el hFcRn (arriba) entran en contacto muy estrecho, así como algunas zonas adyacentes de estas proteínas.

Ejemplo 2: Construcción de las colecciones de inserción

Se construyeron ocho colecciones que codifican regiones Fc de IgG1 humana variantes, teniendo cada colección diferentes tipos de inserciones. La figura 2 muestra la secuencia de región Fc de IgG1 humana y las posiciones y el formato de las seis colecciones de inserción. Las posiciones de los bucles en que se insertaron las colecciones de inserción descritas a continuación se indican en las figuras 1 y 2 como L1, L2A, L2B, L3, L4, L5, L6A y L6B. Algunos sitios de inserción en el Fc están entre los puntos más cercanos de contacto entre Fc de hlgG1 y hFcRn (tales como L1, L2A, L2B y L3) y otros (L4, L5, L6A y L6B) están a alguna distancia de los puntos más cercanos de contacto entre hFc y hFcRn.

Como se muestra en la figura 2, en algunas de las colecciones, tales como L1, L2A, L2B y L3, se eliminaron aminoácidos dentro de un bucle y se remplazaron con aminoácidos aleatorizados, en la mayoría de los casos con un número ligeramente mayor de aminoácidos que el que se había eliminado. Los aminoácidos aleatorizados incluyen todos los aminoácidos distintos de cisteína. En la colección L2B, seis aminoácidos aleatorizados estaban precedidos por la secuencia Gly-Gly-Cys y seguidos por la secuencia Cys-Gly-Gly. Como se esperaría que las dos cisteínas formaran un puente disulfuro dada su proximidad, se esperaría que los seis aminoácidos aleatorizados entre las cisteínas formaran un bucle restringido espacialmente. Por ejemplo, en L2B, seis aminoácidos aleatorizados estaban precedidos por la secuencia Gly-Gly-Cys y seguidos por la secuencia Cys-Gly-Gly, creando de este modo bucles restringidos espacialmente que contienen los aminoácidos aleatorizados. En otras colecciones, es decir, L4 y L5, se insertaron aminoácidos aleatorizados sin eliminar ningún aminoácido normalmente presente.

Se usaron dos rondas de PCR para construir las colecciones L1, L2A, L2B, L3, L4 y L5 que codifican un grupo de fragmentos de Fc variantes de IgG1 humana. El molde usado en la primera y segunda serie de reacciones de PCR en la primera ronda de reacciones fue un vector fagómico en que se había insertado ADN que codifica un fragmento de Fc IgG1 humana (SEQ ID NO: 2) para permitir su expresión como parte de una proteína de envuelta del fago en cepas bacterianas apropiadas (pIgG1-Fc). La primera serie de reacciones de PCR en la primera ronda de reacciones usada para generar las colecciones utilizó cebadores directos e inversos para crear fragmentos de PCR que contenían un sitio para la enzima de restricción ApaI en el extremo en dirección 5'. El siguiente cebador directo, que coincidía con las secuencias de vector en dirección 5' de la región que codifica el fragmento de Fc, se usó para toda la primera serie de reacciones de PCR en la primera ronda de reacciones: 5'-GTTCTTCTTAT TAT TCTCAC-3' (SEQ ID NO: 521). Los cebadores inversos, que estaban dentro de las secuencias codificantes de Fc, fueron los siguientes: 5'-GAG GGT GTC CTT GGG TTT TGG GGG-3' (SEQ ID NO: 522; colección L1); 5'-GGT GAG GAC GCT GAC CAC ACG GTA-3' (SEQ ID NO: 523; colecciones L2A y L2B); 5'-ATG CAT CAC GGA GCA TGA GAA GAC-3' (SEQ ID NO: 524; colección L3); 5'-ATT ATG CAC CTC CAC GCC GTC CAC-3' (SEQ ID NO: 525; colección 4); y 5'-ATT GCT CTC CCA CTC CAC GGC GAT-3' (SEQ ID NO: 526; colección L5).

Una segunda serie de reacción de PCR en la primera ronda de reacciones también usó plgG1-Fc como molde y usó un oligonucleótido que coincidía con el complemento de las secuencias del vector en dirección 3' desde las secuencias que codifican Fc como cebador inverso. Este cebador inverso tenía la siguiente secuencia: 5'-CCC ATT CAG ATC CTC TTC-3' (SEQ ID NO: 527). Los cebadores directos usados para estas reacciones fueron los siguientes: colección L1, 5'-AAA CCC AAG GAC ACC CTC (TRIM)₆ ACC CCT GAG GTC ACA TGC-3' (SEQ ID NO: 528); colección L2A, 5'-GTG GTC AGC GTC CTC ACC (TRIM)₆ CAC CAG GAC TGG CTG AAT-3' (SEQ ID NO: 529); colección L2B, 5'-GTG GTC AGC GTC CTC ACC GGT GGT TGT (TRIM)₆ TGT GGT GGT CAC CAG GAC TGG CTG AAT-3' (SEQ ID NO: 530); colección L3: 5'-TCA TGC TCC GTG ATG CAT (TRIM)₅ CAC (TRIM)₁ CAC TAC ACG CAG AAG AGC-3' (SEQ ID NO: 531); colección L4: 5'-GGC GTG GAG GTG CAT AAT GGT GGT TGT (TRIM)₆ TGT GGT GGT GCC AAG ACA AAG CCG CGG-3' (SEQ ID NO: 532); y colección L5: 5'-GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT (TRIM)₆ TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC AAC-3' (SEQ ID NO: 533). En estos oligonucleótidos, "TRIM" representa una mezcla de trinucleótidos que codifican todos los aminoácidos excepto cisteína (mezcla 2 de fosforamida trimérica, n.º de catálogo de Glen Research 13-1992-95). La mezcla es una mezcla equimolar de los siguientes trinucleótidos: AAA, AAC, ACT, ATC, ATG, CAG, CAT, CCG, CGT, CTG, GAA, GAC, GCT, GGT, GTT, TAC, TCT, TGG, TTC. Por tanto, los codones que codifican todos los aminoácidos excepto cisteína estaban representados de forma aproximadamente igual en la mezcla TRIM. Por tanto, "(TRIM)₆" significa que se incluyen seis trinucleótidos aleatorios que codifican cualquier aminoácido excepto cisteína en el oligo.

En una segunda ronda de reacciones de PCR (una para cada colección), los productos de la primera y segunda serie de reacciones de PCR de la primera ronda descrita anteriormente sirvieron como moldes. Los cebadores usados fueron los mismos para todas las colecciones y fueron los siguientes: 5'-GTT CCT TTC TAT TCT CAC-3' (directo; SEQ ID NO: 534) y 5'-CCC ATT CAG ATC CTC TTC-3' (inverso; SEQ ID NO: 535).

Las colecciones L6A y L6B se construyeron en una ronda de PCR, usando plgG1-Fc como molde. En la reacción de PCR descrita a continuación, se cambió un sitio de restricción XmaI (5'-CCCGGG-3') en la región codificante para el fragmento de Fc a un sitio de restricción XhoI (5'-CTCGAG-3') debido a las secuencias de los cebadores. Estas alteraciones fueron mutaciones sinónimas que no codificaban diferentes aminoácidos del plgG1-Fc no modificado y se hicieron porque una digestión de restricción con XhoI más NotI era más eficaz que una digestión con XmaI más NotI. Los cebadores directos usados para estas reacciones fueron los siguientes: colección L6A: 5'-CTG CCC CCA TCT CGA GAT GAG CTG GGT TGT (TRIM)₈ TGT GGT GGT ACC AAC CAG GTC AGC CTG ACC-3' (SEQ ID NO: 536); y colección L6B: 5'-CTG CCC CCA TCT CGA GAT GAG CTG GGT TGT (NNK)₈ TGT GGT GGT ACC AAC CAG GTC AGC CTG ACC-3' (SEQ ID NO: 537). La secuencia del cebador inverso fue 5'-GGC CCC GTG ATG GTG ATG-3' (SEQ ID NO: 538). En L6B, se usó una mezcla de trinucleótidos llamada NNK, que contiene trinucleótidos que codifican los veinte aminoácidos en 32 codones degenerados. En esta mezcla trinucleotídica, "N" representa una posición aleatorizada que es adenosina, guanidina, citidina o timidina y "K" representa una posición parcialmente restringida que es guanidina o timidina.

Para todas las reacciones de PCR, se usaron kits esenciales de PCR (Roche, n.º de catálogo 11 578 553 001) con las siguientes condiciones de reacción: 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 45 segundos - 55 °C durante 45 segundos - 72 °C durante 90 segundos y finalmente 72 °C durante 10 minutos. En ADN de las reacciones de PCR se purificó usando kits de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, 28104). Se digirieron aproximadamente 200 µg de ADN de vector fagómico y 10 µg de producto de PCR purificado (de la tercera ronda de reacciones de PCR) con ApaLI y NotI (para las colecciones L1-L5) y XhoI y NotI (para las colecciones L6A y L6B). El ADN digerido se purificó en gel con kits de purificación de gel QIAquick (QIAGEN, 28704).

El ADN de vector digerido y los productos de PCR de las colecciones en una relación molar de 1:2 se ligaron usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs). La mezcla se incubó a 16 °C durante una noche. El ADN se purificó por precipitación en etanol. Se sometió a electroforesis un total de 25 µg de ADN en 1000 µl de células de *E. coli* XL1 blue electrocompetentes (Stratagene) en un campo de 2,5 kV usando resistencia de 200 Ω y capacitancia de 25 µF para obtener aproximadamente 1×10^9 transformantes de *E. coli*. Los tamaños exactos de las colecciones variaban de 7×10^8 (para L5) a $1,8 \times 10^9$ (para L4). Las células se inocularon en 1000 ml de medio YT 2x (que contiene 16 g/l de triptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura Bacto y 5 g/l de NaCl a un pH de 7,0-7,2) que contenía 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 2 % y se cultivaron hasta que la DO₆₀₀ fue de aproximadamente 0,5. Después de añadieron aproximadamente 3×10^9 unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml) del fago auxiliar M13, y el cultivo se incubó a 37 °C durante 1 h. Las células infectadas entonces se centrifugaron y resuspendieron con 1000 ml de medio YT 2x que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de kanamicina. Las células se cultivaron a 30 °C durante una noche. El fago entonces se precipitó con PEG 6000.

Todas las colecciones usadas en estas transformaciones, distintas de L6A y L6B, contenían seis codones aleatorizados, cada uno de los cuales codificaba diecinueve aminoácidos diferentes y, por lo tanto, se esperaba que codificaran aproximadamente $4,7 \times 10^7$ (19⁶) fragmentos de Fc variantes diferentes. Asimismo, se esperaba que L6A codificara aproximadamente $1,76 \times 10^{10}$ (20⁸) fragmentos de Fc variantes diferentes, ya que contenía ocho codones aleatorizados que codificaban cualquiera de los 20 aminoácidos diferentes. Para colecciones distintas de las colecciones L6A y L6B, dado el número esperado de diferentes variantes en cada colección, los tamaños de colección de aproximadamente 10^9 (que varían de 7×10^8 a $1,8 \times 10^9$) eran 7-33 veces el número de variantes.

Ejemplo 3: Cribado de las colecciones de bucle de Fc

Se realizaron dos rondas de paneo para fagos que expresan fragmentos de Fc variantes que se unen a FcRn con afinidad aumentada en comparación con un fragmento de Fc de tipo silvestre a pH 6,0 (y que tiene una baja afinidad de unión a pH 7,4) de la siguiente manera. En la primera ronda, el fago se resuspendió en un líquido que contenía 0,4 de MES 20 mM, pH 6,0, leche desnatada al 5 %, Tween 20 al 0,05 %. Cada uno de los cuatro pocillos de una inmunoplaaca MAXISORP™ (Nunc, Rochester, NY) se recubrió con 10 µg de hFcRn y se bloqueó con leche desnatada al 5 % y se añadieron 100 µl de fago a 5×10^{11} UFP/ml. Después de 1 h de incubación a 37 °C, los pocillos se lavaron 3-10 veces con MES 20 mM, pH 6,0, Tween 20 al 0,2 %. El fago se eluyó añadiendo 100 µl de disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4 a cada pocillo e incubando la placa durante 1 h a 37 °C. Estos fagos se usaron para reinfestar un cultivo de *E. coli* XL1 blue en crecimiento exponencial, que se cultivó hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Después se añadieron aproximadamente 3×10^9 UFP/ml del fago auxiliar M13 y el cultivo se incubó a 37 °C durante 1 h. Las células infectadas entonces se centrifugaron y se resuspendieron con 1000 ml de medio YT 2x que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de kanamicina. Las células se cultivaron a 30 °C durante una noche. El fago entonces se precipitó con PEG₆₀₀₀.

Usando estos fagos, se realizó una segunda ronda de paneo usando esencialmente los mismos métodos usados en la primera ronda. La rigurosidad del paneo se aumentó ligeramente reduciendo la concentración de FcRn recubierto sobre las placas de microvaloración ligeramente y aumentando el número de lavados. El fago eluido, después de lavar varias veces se usó para reinfestar un cultivo de *E. coli* XL1 blue en crecimiento exponencial a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5, que después se cultivó durante una hora a 37 °C y se sembró en placas que contenían aproximadamente 100 µg/ml de ampicilina y kanamicina para obtener colonias.

Se inocularon colonias individuales en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contenían 120 µl/pocillo de medio YT 2x que contenía 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 2 %. Las células se cultivaron a 37 °C en un agitador hasta que se alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Después, se añadieron 3×10^9 /ml de fago auxiliar M13 a cada pocillo y se encubaron durante 1 h. Las células entonces se centrifugaron y resuspendieron con 180 µl/pocillo de medio YT 2x que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 40 µg/ml de kanamicina. El cultivo entonces se incubó a 30 °C durante una noche en un agitador.

Se añadieron aproximadamente 100 µl de FcRn humano biotinilado a 2 µg/ml a los pocillos de placas MAXISORP™ con 10 µg/ml de estreptavidina. Después de lavar con PBS más Tween 20 al 0,05 % (PBST) cinco veces, se añadió el fago de los cultivos de una noche en tampón MES a pH 6,0 o pH 7,4 a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se usó anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) para detectar el fago de unión, y las placas se puntuaron mediante un lector de placa de microvaloración usando una longitud de onda en el intervalo visible. Se seleccionaron los positivos basándose en una señal superior a pH 5,5 (aproximadamente un 150 % de la señal generada por un fragmento de Fc de control) y una señal que era comparable a la de un fragmento de Fc de control o inferior a pH 7,4. En una segunda ronda de cribado en que se ensayó una única placa de microvaloración de 96 pocillos de colonias aisladas para cada colección, no se detectaron positivos para las colecciones L2B, L3 o L4. Aproximadamente un 20 % de las colonias recogidas para la colección L2A eran positivas, así como aproximadamente un 10 % de las colonias recogidas para las colecciones L6A y L6B. La colección L5 era claramente distinguible de todas las demás colecciones ya que aproximadamente un 90 % de las colonias recogidas eran positivas. Por tanto, la colección L5 era, por amplio margen, la colección que producía la mayoría de positivos. Estos datos indican que el sitio en que se insertan la colección 5 es particularmente favorable para el aislamiento de variantes que aumentan la unión a FcRn a pH 5-6, mientras se mantiene la baja afinidad del fragmento de Fc por FcRn a pH fisiológicos.

Se seleccionaron positivos de las colecciones L2A, L5, L6A y L6B, que se secuenciaron y caracterizaron adicionalmente como se describe a continuación. La unión se evaluó por un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) cuantitativo. Las puntuaciones de ELISA reflejan la afinidad de unión, significando puntuaciones mayores mayor afinidad. Típicamente, puntuaciones mayores de aproximadamente 3 ~ 5 indican unión por encima del fondo. Las secuencias de las inserciones de estos positivos y sus puntuaciones en un ELISA se muestran en la tabla 2 a continuación. Para la colección L5, las inserciones están entre N169 y G170 de acuerdo con la numeración de la figura 2. Para las colecciones 6A y 6B, las inserciones están entre L143 y T144 de acuerdo con la numeración de la figura 2.

Tabla 2: Secuencias y puntuaciones de ELISA de positivos seleccionados

Colección	Control	Puntuación de ELISA pH 6	Puntuación de ELISA pH 7,4	Secuencia de inserción (SEQ ID NO)	Identificador del aislado
L5		95,4	2,8	GGCVFNMFNCGG (SEQ ID NO: 44)	5-106
L5		95,1	15,1	GGCPHMFPCWCGG (SEQ ID NO: 392)	
L5		92,1	28,4	GGCGHWIFCGG (SEQ ID NO: 393)	
L5		91,0	4,4	GGCVFNMFNCGG (SEQ ID NO: 394)	
L5		89,5	23,5	GGCILNFYCGCGG	

ES 2 751 386 T3

Colección	Control	Puntuación de ELISA pH 6	Puntuación de ELISA pH 7,4	Secuencia de inserción (SEQ ID NO)	Identificador del aislado
				(SEQ ID NO: 395)	
L5		88,6	8,9	GGCREPHPFCCGG (SEQ ID NO: 396)	
L5		87,3	1,8	GGCPFEFTQCGG (SEQ ID NO: 397)	
L5		86,5	0,4	GGCQLGSMHCCGG (SEQ ID NO: 398)	
L5		86,3	1,6	GGCYENKTLCCGG (SEQ ID NO: 399)	
L5		82,5	0,4	GGCHLPFAVCCGG (SEQ ID NO: 41)	5-51
L5		82,4	2,0	GGCGHEYMWCCGG (SEQ ID NO: 43)	5-104
L6A		79,5	0,7	GGCRAGYGDASC GG (SEQ ID NO: 400)	
L5		79,2	0,6	GGCMVPFSMCCGG (SEQ ID NO: 401)	
L5		76,7	0,6	GGCWPLQDYCCGG (SEQ ID NO: 42)	5-69
L5		75,5	0,3	GGCELQERWCCGG (SEQ ID NO: 402)	
L5		74,8	0,5	GGCPANWGTCCGG (SEQ ID NO: 403)	
L5		74,2	2,3	GGCMMEFAQCCGG (SEQ ID NO: 404)	
L5		73,4	0,4	GGCQHHIMQCCGG (SEQ ID NO: 405)	
L5		73,1	0,4	GGCYQHHECCGG (SEQ ID NO: 406)	
L5		72,7	0,5	GGCMQMKNWCCGG (SEQ ID NO: 364)	5-96
L5		72,3	0,6	GGCMVPFSMCCGG (SEQ ID NO: 407)	
L5		72	0,4	GGCQKGWVFCGG (SEQ ID NO: 408)	
L5		71,2	0,7	GGCVYDVKKCCGG (SEQ ID NO: 409)	
L6B		68,9	0,8	GGCLKGMHGSAC GG (SEQ ID NO: 410)	
L5		68,6	0,6	GGCNMLWGSCGG (SEQ ID NO: 411)	
L5		67,4	0,4	GGCMQPWAFCCGG (SEQ ID NO: 412)	
L5		65,6	0,5	GGCMTQYNWCCGG (SEQ ID NO: 413)	
L5		65,2	0,3	GGCVNTWWSCGG (SEQ ID NO: 414)	
L5		64,1	0,5	GGCDGRTKYCCGG (SEQ ID NO: 363)	5-92
L5		63,6	0,7	GGCYITQKLCGG (SEQ ID NO: 415)	
L5		63	0,5	GGCETHYTYCCGG (SEQ ID NO: 416)	
L5		62,7	0,4	GGCALYPTNCCGG (SEQ ID NO: 45)	5-112
L5		62,2	0,3	GGCTEQVMWCCGG (SEQ ID NO: 417)	
L5		61,2	0,4	GGCITEFSHCCGG (SEQ ID NO: 418)	
L5		61	0,3	GGCQNRSYWCCGG (SEQ ID NO: 419)	
L5		61	0,5	GGCHGKQFCGG	

ES 2 751 386 T3

Colección	Control	Puntuación de ELISA pH 6	Puntuación de ELISA pH 7,4	Secuencia de inserción (SEQ ID NO)	Identificador del aislado
				(SEQ ID NO: 420)	
L5		60,9	0,3	GGCNPHRTPCGG (SEQ ID NO: 421)	
L5		60,3	0,3	GGCQHSPPLCGG (SEQ ID NO: 422)	
L5		60,2	0,4	GGCNHEETFCGG (SEQ ID NO: 423)	
L5		59,6	0,3	GGCQYPRKLCGG (SEQ ID NO: 424)	
L5		59,2	0,3	GGCIGPFWWCGG (SEQ ID NO: 425)	
L5		59,2	0,3	GGCMQPWINCGG (SEQ ID NO: 426)	
L6B		58,9	0,8	GGCVQHKMGVVC GG (SEQ ID NO: 427)	
L5		58,5	0,5	GGCEMENAWCGG (SEQ ID NO: 428)	
L5		58,3	0,3	GGCPPWPERCGG (SEQ ID NO: 429)	
L5		57,8	0,3	GGCGKHW HQCGG (SEQ ID NO: 359)	5-57
L5		57,7	0,4	GGCHDPEPFCGG (SEQ ID NO: 430)	
L5		57,7	0,5	GGCNEPKYVCGG (SEQ ID NO: 431)	
L5		57,7	0,5	GGCDRPVWFCGG (SEQ ID NO: 432)	
L5		57,2	0,4	GGCHSFKHFCGG (SEQ ID NO: 360)	5-64
L5		57,2	0,7	GGCEIPHSFCGG (SEQ ID NO: 433)	
L5		56,7	0,4	GGCMPYEMHCGG (SEQ ID NO: 434)	
L5		56,1	0,7	GGCQGMWTWCGG (SEQ ID NO: 366)	5-113
L5		55,6	0,7	GGCKRENPYCGG (SEQ ID NO: 435)	
L5		55,5	1,4	GGCAERQYYCGG (SEQ ID NO: 436)	
L5		55,4	0,3	GGCNVLDLFCGG (SEQ ID NO: 437)	
L5		55,2	0,2	GGCKSMISMCGG (SEQ ID NO: 438)	
L5		54,9	0,6	GGCHHKQDQCGG (SEQ ID NO: 439)	
L6B		54,9	0,6	GGCNATLSGYLCGG (SEQ ID NO: 440)	
L5		54,7	0,6	GGCEATMTWCGG (SEQ ID NO: 441)	
L5		54,6	0,3	GGCNVLDLFCGG (SEQ ID NO: 442)	
L5		54,5	0,3	GGCAQQWHHEYCGG (SEQ ID NO: 362)	5-73
L5		54,2	0,7	GGCSRVFKYCGG (SEQ ID NO: 443)	
L5		53,2	0,3	GGCHAPQWECGG (SEQ ID NO: 444)	
L5		53,2	0,4	GGCPLVRADCGG (SEQ ID NO: 445)	
L5		53,2	0,4	GGCMHNEEFCGG (SEQ ID NO: 446)	
L5		52,4	1,2	GGCMFETKWCGG	

ES 2 751 386 T3

Colección	Control	Puntuación de ELISA pH 6	Puntuación de ELISA pH 7,4	Secuencia de inserción (SEQ ID NO)	Identificador del aislado
				(SEQ ID NO: 447)	
L6B		52,1	0,4	GGCNMNEWKSGCGG (SEQ ID NO: 448)	
L5		51,6	0,4	GGCLQNLVCGG (SEQ ID NO: 449)	
L5		51,3	0,2	GGCQTSMKNCGG (SEQ ID NO: 450)	
L5		51,2	0,5	GGCERFHHACGG (SEQ ID NO: 361)	5-66
L5		51,1	0,4	GGCNLGHMPCGG (SEQ ID NO: 451)	
L5		50,5	1,0	GGCWMWAECCGG (SEQ ID NO: 452)	
L5		50,3	0,4	GGCVHNDKLCGG (SEQ ID NO: 453)	
L6B		50,1	0,4	GGCYGKAGMRDCGG (SEQ ID NO: 454)	
L6B		50	0,3	GGCVSAATSRTC GG (SEQ ID NO: 455)	
L5		49,8	0,6	GGCYPQKEICGG (SEQ ID NO: 456)	
L6B		49,2	0,4	GGCNQSSSREACGG (SEQ ID NO: 457)	
L6A		48,5	0,2	GGCNPVSTGAYCGG (SEQ ID NO: 458)	
L5		48,2	1,8	GGCPGHEFRCGG (SEQ ID NO: 459)	
L6B		47,2	0,4	GGCGEYNYVGGCGG (SEQ ID NO: 460)	
L5		47,2	0,9	GGCKWSMTKCGG (SEQ ID NO: 461)	
L5		47	1,4	GGCDWHRMKCGG (SEQ ID NO: 462)	
L5		46,8	3,6	GGCMHSPHACGG (SEQ ID NO: 463)	
L5		46,2	0,9	GGCMMWKVNC GG (SEQ ID NO: 464)	
L6A		45,2	0,3	GGCFTNYASEKCGG (SEQ ID NO: 465)	
L6A		44	0,2	GGCDRFQNVNVC GG (SEQ ID NO: 466)	
L6A		43,8	0,6	GGCERHFPALFC GG (SEQ ID NO: 467)	
L6B		43,6	0,2	GGCTLGSAPTLC GG (SEQ ID NO: 468)	
L6B		43,2	0,3	GGCEMMKNKSGCGG (SEQ ID NO: 469)	
L5		42,4	1,6	GGCEASGQICGG (SEQ ID NO: 470)	
L6B		42,3	0,2	GGCLRNFMKQSCGG (SEQ ID NO: 471)	
L6B		42,2	0,4	GGCPNDTVRDACGG (SEQ ID NO: 472)	
L6B		41,8	0,3	GGCSFSRHMGACGG (SEQ ID NO: 473)	
L6A		41,2	0,2	GGCAKDQHTGSCGG (SEQ ID NO: 474)	
L5		41,1	1,6	GGCLGLRQECGG (SEQ ID NO: 475)	
L6B		41	0,2	GGCNMNEWKSGCGG (SEQ ID NO: 476)	
L5		38,7	1,6	GGCQQIKEWCGG	

Colección	Control	Puntuación de ELISA pH 6	Puntuación de ELISA pH 7,4	Secuencia de inserción (SEQ ID NO)	Identificador del aislado
				(SEQ ID NO: 477)	
L5		36,1	1	GGCDLPNEMCGG (SEQ ID NO: 478)	
L5		35,8	0,7	GGCMFSPHPCGG (SEQ ID NO: 479)	
L5		33,7	0,7	GGCAGPYWACGG (SEQ ID NO: 480)	
L5		31,1	0,8	GGCEQQFVTCGG (SEQ ID NO: 481)	
L5		29,5	1,2	GGCMGWWHLCCG (SEQ ID NO: 482)	
L5		28,4	0,5	GGCPQHGMCGG (SEQ ID NO: 483)	
L5		27,7	1,0	GGCYASPHECGG (SEQ ID NO: 484)	
L5		27,5	2,1	GGCMPPQWMCGG (SEQ ID NO: 485)	
L5		26,9	1,4	GGCDTIGWFCGG (SEQ ID NO: 486)	
L5		26,3	0,7	GGCGIFESWCGG (SEQ ID NO: 487)	
L5		26,1	0,9	GGCGPYKTECGG (SEQ ID NO: 488)	
L5		25,2	0,7	GGCQPQASWCGG (SEQ ID NO: 489)	
L5		25	0,4	GGCDRQVTGFCGG (SEQ ID NO: 490)	
L5		24,9	1,2	GGSQRAPASCGG (SEQ ID NO: 491)	
L5		23,9	1,5	GGCMMREQGCGG (SEQ ID NO: 492)	
L5		22	1,0	GGCLLPNMFCGG (SEQ ID NO: 493)	
L5		21,7	0,3	GGCCPVYQHCGG (SEQ ID NO: 494)	
L5		21,5	1,0	GGCLMSQDLCCG (SEQ ID NO: 495)	
L5		21,3	1,4	GGCGGPYVFCGG (SEQ ID NO: 496)	
	WT*	13-20	0,5-1,3		
	phg*	0,4-0,7	0,3-1,8		
	medios*	0,4-0,7	0,5-0,6		

*Como estas muestras de control se midieron múltiples veces, estos resultados se presentan como un intervalo. "WT" "phg" y "medios" significan, respectivamente, fago que expresa un fragmento de Fc de control, fago que no expresa fragmento de Fc y sin fago.

Ejemplo 4: Estudios sobre velocidades de asociación y disociación de unión

- 5 Para caracterizar adicionalmente algunos de los fragmentos de Fc variantes identificados por el ELISA de fagos, se caracterizó la unión de los fragmentos de Fc variantes a FcRn a pH 6 y 7,4 para un subconjunto de los fragmentos de Fc variantes identificados. El ADN que codifica los aislados de fragmento de Fc variantes seleccionados, todos de la colección L5, se introdujo en un vector de expresión de mamífero, que se usó para transfectar células 293 6E usando PEI desacetilado esencialmente como se describe por Thomas *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 102(16): 5679-5684, 2005).
- 10 Se seleccionaron los aislados que tienen altas puntuaciones de ELISA para la unión a FcRn. Las concentraciones de fragmentos de Fc variantes en medio acondicionado (CM) se midieron usando muestras de CM diluidas 1:2 y 1:10 con biosensores de proteína A (ForteBio, Inc., número de catálogo 18-5010) en Octet Red® (ForteBio Inc., Menlo Park, California). Las concentraciones se calcularon usando una curva patrón creada con una proteína de fusión de Fc purificada.
- 15 El hFcRn biotinilado a 100 nM se capturó en biosensores de estreptavidina (SA) (FortéBio Inc., 18-5019) fuera de línea a TA durante 2 horas. Usando estos biosensores de SA recubiertos con hFcRn biotinilados en el sistema Octet Red®, puede detectarse la asociación y disociación de proteínas no marcadas en tiempo real mediante difracción de la luz. Se diluyeron muestras de CM de fragmento de Fc variante y de control hasta 10 µg/ml a pH 6 o pH 7,4. Se

establecieron tres condiciones de asociación y disociación: (1) a pH 6 y disociación a pH 6; (2) asociación a pH 6 y disociación a pH 7,4; y (3) asociación a pH 7,4 y disociación a pH 7,4. Los biosensores de SA recubiertos con hFcRn biotinilado se sumergieron en tampón a un pH específico durante 1 min y después se remojaron en las muestras que contenían fragmentos de Fc variantes o controles a un pH específico durante 5 min para permitir la unión a FcRn.

Los biosensores de Fc entonces se remojaron en tampón a un pH específico durante 5 minutos más para permitir que los fragmentos de Fc unidos se disociaran de FcRn. La detección de la unión y disociación de los fragmentos de Fc fue posible a través del uso de interferometría de biocapa implementada usando el sistema Octet Red®, de modo que se detectó la unión y disociación en tiempo real.

Las velocidades de asociación y disociación de los fragmentos de Fc variantes a diferentes pH se compararon con los controles. Unión mayor a pH 6, disociación más lenta a pH 6, unión muy débil a pH 7,4 y disociación más rápida a pH 7,4 en comparación con el fragmento de Fc de control fueron los criterios usados para la selección de fragmentos de Fc variantes para caracterización adicional. Varios de los 61 fragmentos de Fc variantes ensayados mostraron más unión y disociación más lenta a pH 6 y disociación comparable o más rápida a pH 7,4 después de la unión a pH 6 con respecto a un fragmento de Fc de control. La figura 3 muestra las curvas de unión a pH 6 (a la izquierda de la línea vertical central) y disociación a pH 7,4 (a la derecha de la línea vertical central) para 24 fragmentos de Fc variantes ensayados que tenían las propiedades más favorables. A la derecha de las curvas, se enumera el nombre de cada fragmento de Fc variante ensayado junto con la respuesta de unión máxima (en nanómetros (nm)) observado durante la fase de asociación del experimento. El número absoluto para la respuesta máxima puede variar algo de un experimento a otro, y no es directamente proporcional a las constantes de unión tales como K_{on} , K_{dis} o K_D (K_{dis}/K_{on}). En la figura 3, se observó la respuesta de unión más baja con un fragmento de Fc de tipo silvestre, y todas las variantes mostradas tenían respuestas mayores a pH 6. La mayoría de los fragmentos de Fc variantes se disociaron rápidamente a pH 7,4, como un fragmento de Fc de tipo silvestre. Sin embargo, la variante 5-1 se disociaba claramente mucho más lentamente a pH 7,4 que cualquier otra variante, mientras que todas las demás variantes ensayadas se disociaban rápidamente a pH 7,4, como el fragmento de Fc de tipo silvestre. La variante de Fc 5-85 destacó como la variante con la máxima respuesta a pH 6 que también se disociaba rápidamente a pH 7,4. Otras varias variantes, tales como 5-106, 5-104, 5-112, 5-79, 5-51 y 5-69, entre otras, también tenían altas respuestas a pH 6 y rápida disociación a pH 7,4. Por tanto, muchos fragmentos de Fc variantes con propiedades mejoradas se aislaron de la colección L5.

Ejemplo 5: Producción de fragmentos de Fc variantes

El ADN que codifica aislados seleccionados, todos de la colección L5, se introdujo en un vector de expresión de mamífero, que se usó para transfectar células 293 usando PEI desacetilado esencialmente como se describe por Thomas *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. 102(16): 5679-5684, 2005). Se eligieron células de mamífero debido a la facilidad de expresión y procesamiento postraduccional en este sistema. Los métodos de expresión y producción de proteínas usados se describen en Durocher *et al.* (Nucl. Acids Res. 30(2): e9, 2002). Los fragmentos de Fc variantes secretados se purificaron del medio de cultivo usando cromatografía de afinidad de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaño. Se usó cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para comprobar la pureza de los fragmentos de Fc. Para directrices generales sobre métodos de purificación, véase *Methods in Molecular Biology: Protein Purification Protocols* v.244, Culti, ed., Humana, Nueva Jersey, 2004. Se evaluaron los títulos de proteína de las variantes de Fc por tinción con azul de Coomassie de un gel de poliacrilamida. Todos los aislados se expresaron a niveles adecuados para su ensayo.

Ejemplo 6: Estabilidad térmica de fragmentos de Fc variantes

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) mide la entalpía (ΔH) de desplegamiento debido a desnaturalización por calor. Las moléculas proteínicas (u otras macromoléculas) en disolución están en equilibrio entre las poblaciones plegadas nativas y las poblaciones desplegadas desnaturalizadas. Cuanto mayor es el punto medio de transición térmica (T_m), cuando un 50 % de las moléculas proteínicas están desplegadas, más estable es la molécula. También se usa DSC para determinar el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) de desnaturalización. Se realizaron experimentos de DSC con DSC capilar VP MicroCal (GE Healthcare, Piscataway, NJ) para medir la T_m de los diversos fragmentos de Fc. La concentración del fragmento de Fc de control (Fc-WT) o variante purificado en cada experimento fue de 0,5 mg/ml en acetato de sodio 10 mM, sacarosa al 9 % a pH 5. Las muestras se calentaron de 20 °C a 95 °C a una tasa de calentamiento de 60 °C/hora. Los puntos medios de transición térmica (T_m) de los dominios individuales se determinaron cuando un 50 % del dominio individual estaba desplegado. Los valores de T_m de los fragmentos de Fc variantes y el fragmento de Fc de tipo silvestre de control se enumeran en la table 3 a continuación.

Tabla 3: Valores de T_m de los fragmentos de Fc variantes

Identificador de la muestra	T_m del dominio C _H 2 (°C)	T_m del dominio C _H 3 (°C)
Fc-WT	67,7	84,3
Fc-5-55	67,7	77,5
Fc-5-60	67,7	78,4
Fc-5-64	67,4	79,2
Fc-5-69	68,3	76,2

Identificador de la muestra	Tm del dominio CH2 (°C)	Tm del dominio CH3 (°C)
Fc-5-70	67,3	77,7
Fc-5-73	67,7	78,8
Fc-5-79	67,3	76,5
Fc-5-85	66,5	73,4
Fc-5-91	67,4	77,6
Fc-5-92	67,5	79,5
Fc-5-95	67,1	77
Fc-5-96	67,0	79,2
Fc-5-97	67,4	78,2
Fc-5-99	67,0	78,2
Fc-5-101	67,0	78,6
Fc-5-104	67,1	78,0
Fc-5-106	66,6	77,4
Fc-5-112	67,2	77,1
Fc-5-113	68,1	77,9
Fc-5-1	68,4	77,4
Fc-5-51	67,4	77,4
Fc-5-57	67,1	79,1
Fc-5-66	67,5	79

Estos datos indican que la Tm del dominio CH2 no se veía afectada sustancialmente por las inserciones de la colección L5, que están en el dominio CH3. Aunque la Tm del dominio CH3 estaba ligeramente disminuida en los fragmentos de Fc variantes en comparación en fragmento de Fc de control (Fc-WT), los valores de Tm del dominio CH3 en los fragmentos de Fc variantes aún son aproximadamente 10 °C mayores que los valores de Tm del dominio CH2. Por tanto, el umbral inferior de la estabilidad térmica del dominio Fc completo, es decir, la Tm del dominio CH2, no se ve afectado.

Ejemplo 7: Unión de fragmentos de Fc variantes a FcRn humano o de macaco cangrejero

Se ensayó la unión de fragmentos de Fc variantes a FcRn humano y de macaco cangrejero usando un sistema de análisis BIAcore® T100 (GE Healthcare Bio-Sciences AB Private Limited Liability Company, Uppsala, Suecia) tanto a pH 5,5 como a pH 7,4. El ensayo consistía en incubar diversas concentraciones de los fragmentos de Fc variantes o fragmentos de Fc de control con una cantidad fija de FcRn humano o de macaco cangrejero en condiciones de unión y medir posteriormente la cantidad de FcRn sin unir libre en estas mezclas por la unión a una superficie (en una cubeta de lectura de un chip CM5 (Biacore)) en que se inmovilizó un fragmento de Fc. El fragmento de Fc inmovilizado en el chip era de cantidad suficiente para unirse esencialmente a todo el FcRn sin unir libre en la mezcla. Por tanto, la cantidad de FcRn sin unir en la mezcla se averiguó cuantitativamente por resonancia de plasmones superficiales a través del uso del sistema de análisis BIAcore® T100. A partir de esta información, se calculó una CE₅₀, es decir, la concentración del fragmento de Fc variante o de control a la que un 50 % del FcRn en la mezcla estaba unido. Inicialmente, se ensayó un grupo de 23 fragmentos de Fc variantes (considerando Fc-5-1 un control) identificados en los experimentos descritos anteriormente para la unión a FcRn humano. Basándose en estos datos, se seleccionaron catorce fragmentos de Fc variantes y se ensayaron adicionalmente para la unión a FcRn de macaco cangrejero.

El protocolo experimental se describe en mayor detalle a continuación. Los fragmentos de Fc a ensayar se produjeron en células 293 y se purificaron como se describe anteriormente. Se inmovilizó un fragmento de Fc de control humano de tipo silvestre (Fc-WT) y un fragmento de Fc variante (Fc-5-1) en las cubetas de lectura de un chip CM5 (Biacore) usando acoplamiento de amina con densidad de aproximadamente 6000 unidades de resonancia (UR). Se usó Fc-5-1 porque, a diferencia de Fc-WT, se une a FcRn bien a pH 7,4. Se usó una cubeta de lectura sin proteína inmovilizada unida a la misma como control de fondo. Fue posible usar una única cubeta de lectura para muestras sucesivas lavando entre las muestras con una disolución a pH 7,4 para liberar el FcRn unido al fragmento de Fc inmovilizado en la cubeta de lectura.

Para obtener una señal razonable para las diferentes moléculas y condiciones ensayadas, se usaron diferentes condiciones de ensayo. Para los ensayos a pH 5,5, se mezcló 10 nM de FcRn humano o de macaco cangrejero con diluciones en serie de los fragmentos de Fc variantes y de control que se estaban ensayando (que variaban de 0,1 ~ 2.000 nM) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en acetato de sodio 10 mM, pH 5,5, NaCl 150 mM, P20 al 0,005 %, 0,1 mg/ml de BSA. Como controles positivos, se incubaron FcRn humano y de macaco cangrejero cada uno 10 mM en la misma disolución, durante el mismo tiempo y a la misma temperatura descrita justo anteriormente, pero sin un fragmento de Fc añadido. En estas muestras, supuestamente todo el FcRn estaba sin unir. La unión del FcRn sin unir libre en cada una de estas mezclas al Fc-WT y Fc-5-1 inmovilizado se midió inyectando las mezclas sobre las superficies de las cubetas de lectura y detectando el FcRn unido a las superficies mediante resonancia de plasmones superficiales.

Para los ensayos a pH 7,4, se mezcló FcRn humano y de macaco cangrejero 10 nM con diluciones en serie de los fragmentos de Fc variantes y de control que se estaban ensayando (que variaban de 0,1 ~ 2.000 nM) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con polisorbato 20 al 0,005 %, 0,1 mg/ml de BSA. Como controles positivos, se incubó FcRn humano y de macaco cangrejero cada uno 10 mM en la misma disolución, durante el mismo tiempo y a la misma temperatura descritos justo anteriormente, pero sin un fragmento de Fc añadido. Las cantidades de FcRn sin unir libre en estas mezclas se determinaron por unión al fragmento de Fc Fc-5-1 inmovilizado, que se midió inyectando estas mezclas sobre la superficie de una cubeta de lectura con Fc-5-1 y detectando el FcRn unido a las superficies mediante resonancia de plasmones superficiales. Se usó Fc-5-1- en estos ensayos porque se une a FcRn con afinidad mucho mayor que Fc-WT a pH 7,4.

Una respuesta de unión a FcRn disminuida con concentraciones crecientes de fragmento de Fc en las mezclas indicaba que FcRn se unía al fragmento de Fc en disolución, que bloqueaba FcRn de su unión al fragmento de Fc inmovilizado sobre las superficies de las cubetas de lectura. Representando la señal de unión a FcRn frente a las concentraciones de fragmento de Fc, se calcularon las CE₅₀ usando regresión no lineal de competición de un sitio en el programa informático GraphPad Prism 5™. Estos resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. CE₅₀ de fragmentos de Fc para la unión a FcRn a pH 5,5 y 7,4

Muestra	FcRn humano pH 5,5		FcRn humano pH 7,4		FcRn de macaco pH 5,5		FcRn de macaco pH 7,4	
	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)
Fc-WT	290	200~430	>2000		270	200~360	>2000	
Fc-5-1	2,6	1,4~4,7	45	33-61	2,3	1,2~4,5	42	28-63
Fc-5-51	16	13~19	>2000		21	12~36	>2000	
Fc-5-55	49	35~69	>2000		53	46~62	>2000	
Fc-5-57	180	110~310	>2000		ND*		ND	
Fc-5-60	67	48~94	>2000		60	43~85	>2000	
Fc-5-64	210	113~375	>2000		ND		ND	
Fc-5-66	200	170~230	>2000		ND		ND	
Fc-5-69	14	12~17	>2000		18	14~23	>2000	
Fc-5-70	26	20~32	>2000		27	18~39	>2000	
Fc-5-73	190	120~290	>2000		ND		ND	
Fc-5-79	53	45~64	>2000		63	48~81	>2000	
Fc-5-85	18	15~21	>2000		25	14~43	>2000	
Fc-5-91	57	40~110	>2000		ND		ND	
Fc-5-92	75	54~106	>2000		ND		ND	
Fc-5-95	42	31~56	>2000		50	37~67	>2000	
Fc-5-96	76	58~110	>2000		ND		ND	
Fc-5-97	25	19~32	>2000		31	27~36	>2000	
Fc-5-99	15	11~19	>2000		16	10~25	>2000	
Fc-5-101	100	60~170	>2000		ND		ND	
Fc-5-104	15	3~67	>2000		16	14~19	>2000	
Fc-5-106	5,3	4,5~6,4	>2000		3,6	2,4~5,3	>2000	
Fc-5-110	250	140~460	>2000		ND		ND	
Fc-5-112	46	38~56	>2000		49	34~72	>2000	
Fc-5-113	20	12~33	>2000		27	21~35	>2000	

* ND indica "no determinado"

Los datos en la tabla 4 indican que muchos de los fragmentos de Fc variantes ensayados tienen unión sustancialmente mejorada a FcRn humano a pH 5,5 (es decir, tienen una CE₅₀ sustancialmente inferior en comparación con Fc-WT) y mantienen una baja unión a pH 7,4 (es decir, tienen una alta CE₅₀, como la de Fc-WT). Sin embargo, cinco de ellos (Fc-5-57, Fc-5-64, Fc-5-66, Fc-5-73 y Fc-5-110) no mostraron unión muy mejorada a pH 5,5. Ocho de ellos (Fc-5-55, Fc-5-60, Fc-5-79, Fc-5-91, Fc-5-92, Fc-5-96, Fc-5-101 y Fc-5-112) mostraron una mejora de casi aproximadamente 2~5x en la unión a pH 5,5. Estos datos indican además que las CE₅₀ de los fragmentos de Fc variantes para la unión a FcRn humanos y de macacos cangrejeros son comparables. Todos los fragmentos de Fc variantes ensayados (distintos de Fc-5-1, que se consideró un control) mantenían la baja unión tanto a FcRn humano como de macaco cangrejero a pH 7,4.

Ejemplo 8: Construcción de fragmentos de Fc variantes modificados adicionalmente

Se prepararon versiones modificadas adicionalmente de los fragmentos de Fc variantes Fc-5-69 y Fc-5-106. Las variantes de Fc-5-69 se prepararon de la siguiente manera. Se insertó ADN que codifica el fragmento de Fc variante Fc-5-69 en un vector de expresión de mamífero que también podía propagarse en *E. coli*, que se usó como molde.

Para la variante Fc-5-69-W1F, se usaron los dos siguientes cebadores: directo, GAG AGC AAT GGT GGT TGT TTC CCG CTG CAG GAC TAC (SEQ ID NO: 497); e inverso, GTA GTC CTG CAG CGG GAA ACA ACC ACC ATT GCT CTC (SEQ ID NO: 498). Para Fc-5-69-W1Y, se usaron los dos siguientes cebadores: directo, GAG AGC AAT GGT GGT TGT TAC CCG CTG CAG GAC TAC (SEQ ID NO: 499); e inverso, GTA GTC CTG CAG CGG GTA ACA ACC ACC ATT GCT CTC (SEQ ID NO: 500). Se usó el protocolo del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, 200518). La mezcla de reacción era dNTP 200 nM, cebadores 100 nM, 1 ng de molde ADN, 1 µl de ADN polimerasa y agua en un volumen total de 50 µl. La reacción se procesó a 95 °C durante 30 segundos, después 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 60 segundos, 68 °C durante 6 minutos, seguido de 68 °C durante 10 minutos. Después, se añadió un 1 µl de DpnI y la reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se usaron 2 µl de la mezcla para transformar 30 µl de células supercompetentes XL1 blue (Stratagene) a 42 °C durante 45 segundos. Después de ello, se añadieron 0,5 ml de SOC, y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora en un agitador a 300 revoluciones por minutos (r.p.m.). Las células transformadas se extendieron en placas de agar de LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C durante una noche.

Se recogieron colonias individuales y se preparó y secuenció el ADN plasmídico. Las secuencias de ADN indicaron que los fragmentos de Fc variantes tenían las siguientes secuencias de aminoácidos insertadas, que diferían en un aminoácido del inserto de Fc-5-69: Fc-5-69-W1F, GGCFLQDYCGG (SEQ ID NO: 367); y Fc-5-69-W1Y, GGCYPLQDYCGG (SEQ ID NO: 368). El ADN que codifica estos fragmentos de Fc variantes se introdujo en células 293 y se produjeron fragmentos de Fc purificados como se describe anteriormente para su uso en ensayos de unión Biacore® realizados como se describe anteriormente.

Se prepararon versiones modificadas de Fc-5-106 por métodos similares excepto que el molde para las reacciones de PCR era un ADN que codifica Fc-5-106 insertado en un vector de expresión de mamífero. Los cebadores usados para las reacciones de PCR tenían las siguientes secuencias: Fc-5-106-M4A, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC GCG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 501) e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CGC GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 502); Fc-5-106-M4G, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC GGG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 503), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CCC GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 504); Fc-5-106-M4H, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC CAT TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 505), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA ATG GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 506); Fc-5-106-M4I, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC ATC TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 507), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA GAT GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 508); Fc-5-106-M4L, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC TTG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 509), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CAA GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 510); Fc-5-106-M4N, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC AAC TGT AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 511), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA GTT GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 512); Fc-5-106-M4Q, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC CAG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 513), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CGA GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 516); Fc-5-106-M4T, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC ACG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 517), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CGT GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 518); Fc-5-106-M4V, directo, GGT GGT TGT GTT TTC AAC GTG TTC AAC TGT GGT GGT GGG (SEQ ID NO: 519), e inverso, CCC ACC ACC ACA GTT GAA CAC GTT GAA AAC ACA ACC ACC (SEQ ID NO: 520).

Las reacciones de PCR se realizaron como se describe anteriormente y se usaron para transformar *E. coli*. Se secuenciaron los ADN plasmídicos de colonias individuales. Se seleccionaron aislados que codificaban fragmentos de Fc que tienen las siguientes secuencias insertadas: Fc-5-106-M4A, GGCVFNAFNCGG (SEQ ID NO: 369); Fc-5-106-M4G, GGCVFNGFNCGG (SEQ ID NO: 370); Fc-5-106-M4H, GGCVFNFHNCGG (SEQ ID NO: 371); Fc-5-106-M4I, GGCVFNFIFNCGG (SEQ ID NO: 372); Fc-5-106-M4L, GGCVFNLFNCGG (SEQ ID NO: 373); Fc-5-106-M4N, GGCVFNNFNCGG (SEQ ID NO: 374); Fc-5-106-M4Q, GGCVFNQFNCGG (SEQ ID NO: 375); Fc-5-106-M4S, GGCVFNSFNCGG (SEQ ID NO: 376); Fc-5-106-M4T, GGCVFNTFNCGG (SEQ ID NO: 377); Fc-5-106-M4V, GGCVFNVFNCGG (SEQ ID NO: 378).

Estos derivados de Fc-5-69 y Fc-5-106 se prepararon y ensayaron para la afinidad de unión relativa a FcRn humano y de macaco cangrejero a pH 5,5 y 7,4 usando los métodos descritos en el ejemplo 7.

Tabla 5: Unión de variantes de 5-69 y Fc-5-106 a FcRn humano y macaco cangrejero

Muestra	FcRn humano pH 5,5		FcRn humano pH 7,4		FcRn de macaco pH 5,5		FcRn de macaco pH 7,4	
	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)
Fc-WT	270	170~440	>2000		250	130~470	>2000	
Fc-5-69	20	13~30	1100	960~1400				
Fc-5-69- W1F	57	36~89	>2000					
Fc-5-69- W1Y	140	75~240	>2000					

	FcRn humano pH 5,5		FcRn humano pH 7,4		FcRn de macaco pH 5,5		FcRn de macaco pH 7,4	
Muestra	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)	CE ₅₀ (nM)	95 % CI (nM)
Fc-5-106	5,4	3,7~8,0	1400	1100~1700	4,6	3,5~6,1	>2000	
Fc-5-106- M4A	27	16~45	>2000					
Fc-5-106- M4G	100	66~160	>2000					
Fc-5-106- M4H	100	48~230	>2000					
Fc-5-106-M4I	2,6	1,8~3,6	900	760~1100	3,2	2,1~4,8	970	810~1200
Fc-5-106-M4L	2,3	1,5~3,4	650	460~920	2,8	1,6~4,7	710	460~1100
Fc-5-106- M4N	100	52~180	>2000					
Fc-5-106- M4Q	34	17~68	>2000					
Fc-5-106- M4S	58	32~106	>2000					
Fc-5-106- M4T	10	4,4~21	>2000		8,3	5,3~13	>2000	
Fc-5-106- M4V	6,2	3,6~11	>2000		5,0	3,4~7,3	>2000	

Ambos derivados de Fc-5-69 mostraron afinidad de unión más débil que el propio Fc-5-69 a pH 5,5. Dos derivados de Fc-5-106 (Fc-5-106-M4I y Fc-5-106-M4L) mostraron mayor afinidad de unión a FcRn humano y de macaco a pH 7,4 en comparación con Fc-5-106. Además, cuatro de los derivados de Fc-5-106 incluyendo estos dos (Fc-5-106-M4I, Fc-5-106-M4L, Fc-5-106-M4T y Fc-5-106-M4V) mostraron actividad de unión mejorada o aproximadamente igual a pH 5,5 en comparación con el propio Fc-5-106. Estos cuatro se ensayaron para la afinidad de unión a FcRn de macaco cangrejero. Los cuatro tenían CE₅₀ para la unión a FcRn de macaco cangrejero que eran similares a aquellas para FcRn humano tanto a pH 5,5 como a 7,4.

Ejemplo 9: Caracterización *in vivo* de fragmentos de Fc variantes

Para determinar si los anticuerpos que contienen los fragmentos de Fc variantes identificados anteriormente tienen propiedades farmacocinéticas (PK) mejoradas *in vivo*, se ensayaron un anticuerpo X sin modificar (que es un anticuerpo IgG2 humana anti-IL-23 humana) y versiones variantes de anticuerpo X que contienen fragmentos de Fc variantes *in vivo* en macacos cangrejeros para definir los parámetros farmacocinéticos. El anticuerpo X se seleccionó como anticuerpo apropiado en el que ensayar los parámetros farmacocinéticos de los fragmentos de Fc variantes porque se sabe que tiene un perfil pK lineal y porque se sabe que se expresa IL-23 a bajas concentraciones *in vivo*. Por tanto, se esperaba que los efectos relacionados con la diana sobre los parámetros PK fueran mínimos, haciendo más fácil detectar los efectos pK debido a los fragmentos de Fc variantes.

Se prepararon cinco anticuerpos IgG2 variantes llamados (X-5-51, X-5-69, X-5-104, X-5-106 y X-5-112). Estos anticuerpos IgG2 tenían las mismas inserciones en las mismas posiciones (de acuerdo con la alineación de la tabla 1) que los fragmentos de Fc de IgG1 variantes Fc-5-51, Fc-5-69, Fc-5-104, Fc-5-106 y Fc-5-112, respectivamente. Más específicamente, las inserciones estaban entre los aminoácidos 384 y 385 (numeración EU como en la tabla 1) en el fragmento de Fc de IgG2 humana. Se usó un plásmido que contenía ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo X como molde para cinco reacciones de PCR hechas usando los siguientes cebadores: para X-5-51, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT CAT CTG CCG TTC GCT GTT TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 539), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA AAC AGC GAA CGG CAG ATG ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 540); para X-5-69, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT TGG CCG CTG CAG GAC TAC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 541), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GTA GTC CTG CAG CGG CCA ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 542); para X-5-104, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 543), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACA CCA CAT GTA TTC ATG ACC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 544); para X-5-106, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GTT TTC AAC ATG TTC AAC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 545), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GTT GAA CAT GTT GAA AAC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 546); y para X-5-112, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GCT CTG TAC CCG ACT AAC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 547), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GTT AGT CGG GTA CAG AGC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 548). Se usó el protocolo del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, 200518). La mezcla de reacción era dNTP 200 nM, cebadores 100 nM, 1 ng de molde de ADN, 1 µl de ADN polimerasa y agua en un volumen total de 50 µl. La reacción se procesó a 95 °C durante 30 segundos, después 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 60 segundos, 68 °C durante 6 minutos, seguido de 68 °C durante 10 minutos. Después se añadió 1 µl de DpnI, y la reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se usaron 2 µl de la mezcla para transformar 30 µl de células supercompetentes XL1 blue (Stratagene) a 42 °C durante 45 segundos. Después de ello, se añadieron 0,5 ml de SOC y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora en un agitador a 300 r.p.m. Las células transformadas se extendieron en placas de agar de LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se recogieron colonias individuales y se preparó el ADN plasmídico y se secuenció para asegurar que los aislados elegidos tenían la secuencia de ADN esperada.

Se prepararon anticuerpos esencialmente de la misma manera que se describe anteriormente para fragmentos de Fc, excepto que las células hospedadoras de mamífero se transfectaron con ADN que codifican tanto la cadena pesada de IgG2, incluyendo una parte que codifica un fragmento de Fc variante o de control, como la cadena ligera de anticuerpo X. Las hospedadoras se incubaron en condiciones apropiadas para la expresión de los anticuerpos, y los anticuerpos se recuperaron del medio de cultivo, se purificaron como se describe anteriormente y se usaron para los siguientes experimentos.

Macacos cangrejeros (n=2/grupo) recibieron una única dosis intravenosa de una versión no modificada o una variante de anticuerpo X a una dosis de 1 mg/kg y se hizo un seguimiento durante una fase en vida de 8 semanas. Se recogieron muestras de sangre en puntos temporales especificados a lo largo del curso del experimento. Se recogieron muestras antes de la dosis 0,25, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 408, 504, 576, 672, 744, 840, 1008, 1176 y 1344 horas después de la dosis.

Se usó un ELISA emparejado anti-IgG humana para determinar las concentraciones sistémicas de los anticuerpos inyectados por comparación con una curva patrón derivada de la misma molécula. Específicamente, se diluyó un anticuerpo de ratón anti-Fc humano en PBS, se recubrió sobre placas y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se descartaron los contenidos de los pocillos y se añadió PBS-Tween 20 (SuperBlock®, Thermo Scientific) a los pocillos como tampón de bloqueo. Después de incubación durante una hora a temperatura ambiente, los pocillos de la placa se lavaron con PBS-Tween 20 y se añadieron muestras de suero a los pocillos y se incubaron durante 1 hora con agitación. Los pocillos se lavaron de nuevo y se añadió un anticuerpo de ratón anti-Fc humano marcado con peroxidasa de rábano rusticano a las placas. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron y revelaron durante 10 minutos usando un sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción colorimétrica resultante se detuvo con ácido fosfórico o sulfúrico añadido a la placa. Se determinaron las densidades ópticas (DO) a 450 nm y 650 nm, y se restó la DO a 650 nm de la DO a 450 nm. La conversión de los valores de DO en concentraciones para las muestras de estudio se consiguió a través de regresión de los datos usando un modelo logístico con ponderación establecida a $1/Y^2$ en Watson LIMS versión 7.0.0.04.

Se realizó análisis farmacocinético usando el paquete analítico de PK proporcionado en Watson LIMS, versión 7.0.0.04. se obtuvieron los valores de exposición (área bajo la curva (ABC)) y eliminación (ml/kg/h) a partir de este análisis. Se usaron datos de concentración frente al tiempo para al menos 5 puntos temporales de muestreo para cada macaco cangrejero para calcular los valores de semivida ($T_{1/2}$).

Como se muestra en la figura 4, las versiones variantes de anticuerpo X que contenían los fragmentos de Fc variantes X-5-51, X-5-69, X-5-104, X-5-106 y X-5-112 demostraron todas mayores concentraciones de mAb en macacos cangrejeros en un punto temporal de muestreo dado en comparación con anticuerpo X sin modificar. Como se muestra en la tabla 6, se demostraron valores de exposición aumentados y valores de eliminación disminuidos para todas las versiones variantes de anticuerpo X ensayadas en comparación con anticuerpo X sin modificar. Además, cuatro de las cinco versiones variantes de anticuerpo X tenían semividas aumentadas. La variante que no mostraba una semivida aumentada (X-5-106), puede representar una situación donde pueden haberse desarrollado anticuerpos antifármaco contra el anticuerpo inyectado en un mono, ya que los datos de uno de los dos monos ensayados indicaron una semivida muy corta (48 horas), mientras que los datos del otro mono indicaron una semivida aumentada (538 horas). Experimentación adicional para medir la presencia de anticuerpos antifármaco puede aclarar esta cuestión.

Tabla 6: Valores medios para la semivida, exposición y eliminación

	Anticuerpo X sin modificar	X- 5-51	X-5-69	X-5-104	X-5-106	X-5-112
$T_{1/2}$ (horas)	335	910	550	477	191	520
ABC - exposición (ug*h/ml)	3890	6640	4960	5745	6005	7810
Eliminación (ml/kg/h)	0,247	0,109	0,173	0,153	0,154	0,108

En general estos datos indican que la unión aumentada de un fragmento de Fc variante a FcRn a pH 5,5-6,0 (con respecto a un fragmento de Fc de control) y la rápida disociación de FcRn a pH 7,4 se correlacionan con una semivida en vivo más larga de un anticuerpo que contiene el fragmento de Fc variante en macacos cangrejeros. Sin embargo, no se muestra una relación cuantitativa exacta entre el grado de mejora en la unión a pH 5,5 o 6 de un fragmento de Fc variante de IgG1 y el grado de mejora en los parámetros farmacocinéticos para un anticuerpo IgG2 de longitud completa que tiene la misma inserción que el fragmento de Fc variante, por estos datos. Estos datos indican, sin embargo, que X-5-51, X-5-69, X-5-104 y X-5-112 tienen semividas aumentadas con respecto al anticuerpo X sin alterar y sugieren que lo mismo es cierto para X-5-106. Además, todos los anticuerpos variantes ensayados tenían tasas de eliminación inferiores y mayor exposición en comparación con el anticuerpo de control.

Ejemplo 10: Construcción de fragmentos de Fc variantes con inserciones en sitios alternos

El hecho de que muchas variantes de la colección L5 tuvieran propiedades deseables indicaba que la posición de estas inserciones era favorable. Se hicieron los siguientes experimentos para determinar si otros sitios dentro de o adyacentes al mismo bucle que el sitio de inserción de L5 pudieran tener mejores propiedades. Para ensayar esta

idea, se insertó uno de los péptidos seleccionados en diferentes ubicaciones en este bucle, y los fragmentos de Fc variantes resultantes se ensayaron para la unión a FcRn. La inserción del péptido del fragmento de Fc variante 5-1 se eligió como péptido a insertar. Este péptido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: GGCGMPIEFCGG (SEQ ID NO: 67). Como se muestra en la figura 5 (que usa el sistema de numeración EU como se ejemplifica en la tabla 1), este péptido se insertó en sitios dentro de o adyacentes al bucle de la colección L5 distintos del sitio de inserción de la colección L5. La unión de los fragmentos de Fc resultantes a FcRn se ensayó usando biosensores de SA (ForteBio Inc. 18-5019) recubiertos con huFcRn biotinilado como se describe en el ejemplo 4 anterior.

En más detalle, las construcciones de ADN que codifican estos fragmentos de Fc variantes se prepararon de la siguiente manera. Se usó el protocolo del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange® (Stratagene, 200518). La mezcla de reacción estaba compuesta de dNTP 200 nM, cebadores 100 nM, 1 ng de molde de ADN, 1 µl de ADN polimerasa y agua hasta un volumen total de 50 µl. Los cebadores usados en estas reacciones para cada variante se muestran a continuación en la tabla 7. El molde de ADN era un ADNc que codifica un polipéptido Fc de IgG1 humana de tipo silvestre insertado en un vector. La reacción se procesó a 95 °C durante 30 segundos, después 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 60 segundos y 68 °C durante 6 minutos, seguido de un ciclo final de 68 °C durante 10 minutos. Después se añadió 1 µl de DpnI y la reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. después, se usaron 2 µl de la mezcla para transformar 30 µl de células de *E. coli* supercompetentes XL1 blue (Stratagene) a 42 °C durante 45 segundos. Después de ello, se añadieron 0,5 ml de caldo superóptimo con represión de catabolitos (SOC; que contiene triptona Bacto al 2 %, extracto de levadura al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM) y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora en un agitador a 300 revoluciones por minuto (r.p.m.). Las células transformadas se extendieron en placas de agar de LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C durante una noche.

Tabla 7: Cebadores usados en reacciones de PCR para la construcción de ADN que codifican fragmento de Fc variante

Denominación del fragmento de Fc variante	Cebador directo	Cebador inverso
5-1-1	5'- GCT GTG GAG TGG GAG GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT AGC AAT GGG CAG CCG-3' (SEQ ID NO:68)	5'- CGG CTG CCC ATT GCT ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC CTC CCA CTC CAC AGC-3' (SEQ ID NO:69)
5-1-2	5'- GTG GAG TGG GAG AGC GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT AAT GGG CAG CCG GAG-3' (SEQ ID NO:70)	5'- CTC CGG CTG CCC ATT ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC GCT CTC CCA CTC CAC-3' (SEQ ID NO:71)
5-1-3	5'- TGG GAG AGC AAT GGG GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT CAG CCG GAG AAC AAC-3' (SEQ ID NO:72)	5'- GTT GTT CTC CGG CTG ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC CCC ATT GCT CTC CCA-3' (SEQ ID NO:73)
5-1-4	5'- GAG AGC AAT GGG CAG GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT CCG GAG AAC AAC TAC-3' (SEQ ID NO:74)	5' GTA GTT GTT CTC CGG ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC CTG CCC ATT GCT CTC-3' (SEQ ID NO:75)
5-1-5	5'- AGC AAT GGG CAG CCG GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT GAG AAC AAC TAC AAG-3' (SEQ ID NO:76)	5'- CTT GTA GTT GTT CTC ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC CGG CTG CCC ATT GCT-3' (SEQ ID NO:77)
5-1-6	5'- AAT GGG CAG CCG GAG GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT AAC AAC TAC AAG ACC-3' (SEQ ID NO:78)	5'-GGT CTT GTA GTT GTT ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC CTC CGG CTG CCC ATT-3' (SEQ ID NO:79)
5-1-7	5'-GGG CAG CCG GAG AAC GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT AAC TAC AAG ACC ACG-3' (SEQ ID NO:80)	5'-CGT GGT CTT GTA GTT ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC GTT CTC CGG CTG CCC-3' (SEQ ID NO:81)

Denominación del fragmento de Fc variante	Cebador directo	Cebador inverso
5-1-8	5'-CAG CCG GAG AAC AAC GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT TAC AAG ACC ACG CCT-3' (SEQ ID NO:82)	5'- AGG CGT GGT CTT GTA ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC GTT GTT CTC CGG CTG-3' (SEQ ID NO:83)
5-1-9	5'- GTG GAG TGG GAG AGC GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT CCG GAG AAC AAC TAC-3' (SEQ ID NO:84)	5'- GTA GTT GTT CTC CGG ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC GCT CTC CCA CTC CAC-3' (SEQ ID NO:85)
5-1-10	5'- GTG GAG TGG GAG AGC GGT GGT GGT TGT GGT ATG CCG ATC GAA TTC TGT GGT GGT GGT CCG GAG AAC AAC TAC-3' (SEQ ID NO:86)	5'- GTA GTT GTT CTC CGG ACC ACC ACC ACA GAA TTC GAT CGG CAT ACC ACA ACC ACC ACC GCT CTC CCA CTC CAC-3' (SEQ ID NO:87)

Se recogieron colonias individuales y se preparó y secuenció el ADN plasmídico. El ADN que codifica estos fragmentos de Fc variantes se introdujo en células 293-6E y los fragmentos de Fc en medio acondicionado (CM) de estas células se usaron en ensayos de unión ForteBio realizados como se describe anteriormente. Véase el ejemplo 4.

- 5 Los resultados para la unión a pH 6 y la disociación a pH 7 se muestran en la figura 6. Dos de los fragmentos de Fc variantes, 5-1-10 y 5-1-2, tuvieron una respuesta máxima mayor que la variante 5-1 a pH 6, pero también se disociaban más lentamente a pH 7,4. Véase la figura 6. Todas las demás construcciones mostraron una respuesta máxima algo menor, en comparación con la variante 5-1, a pH 6, pero todas estas respuestas fueron comparables o mayores que las de un fragmento de Fc de tipo silvestre (denominado FcWT en la figura 6). Además, la disociación de estas construcciones a pH 7,4, a diferencia de la de 5-1, fue comparable con la de FcWT. Por tanto, la mayoría de las variantes de Fc, distintas de 5-1-2 y 5-1-10 (ambas cuales tienen una inserción entre las posiciones 383 y 384), con inserciones dentro de o adyacentes al bucle 10 se disociaban más rápido a pH 7,4 que la variante 5-1. Además, las variantes 5-1-1, 5-1-2, 5-1-3, 5-1-9 y 5-1-10 tenían claramente respuestas máximas mayores que FcWT a pH 6 de la variante 5-1, mientras que las variantes 5-1-6, 5-1-7 y 5-1-8 tuvieron respuestas máximas comparables con las de FcWT. Las variantes 5-1-4 y 5-1-5 tuvieron respuestas solo ligeramente mayores que FcWT. Estos datos indican que la inserción del péptido tenía efectos más favorables en determinados sitios dentro del bucle 10. Específicamente, la inserción entre las posiciones 382 y 383, 383 y 384, 384 y 385, 385 y 386 (usando el sistema de numeración EU como se ilustra en la tabla 1 y en la figura 5) producía variantes de Fc que tenían una respuesta máxima mayor a pH 6 que FcWT más rápida disociación a pH 7,4. Por el contrario, las variantes de Fc que tienen inserciones entre las posiciones 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391 tenían propiedades similares a FcWT. Finalmente, las variantes de Fc que tienen inserciones entre 386 y 387 o 387 y 388 mostraban respuestas ligeramente mayores a pH 6 que FcWT y rápida disociación a pH 7,4. Además, la eliminación de los aminoácidos 384-386 y la inserción del péptido en su lugar, como se hizo en las variantes 5-1-9 y 5-1-10, también mejoró las propiedades de estas variantes de Fc en comparación con FcWT. La inserción ligeramente más larga de 5-1-10, que incluía tres en lugar de dos restos de glicina como en 5-1-9 al inicio y al final de la inserción, tuvo una mayor respuesta que cualquier otra variante, incluyendo 5-1-2, que tenía una inserción (sin eliminación concomitante) entre las posiciones 383 y 384. Estos datos indican que inserciones de un péptido que puede potenciar la unión a FcRn dentro de la región entre las posiciones 382 y 387 pueden potenciar la unión de un fragmento de Fc a FcRn a pH 6, mientras se conserva su rápida disociación de FcRn a pH 7,4. Por otro lado, la inserción de dicho péptido entre las posiciones 388 y 391 no potenció sustancialmente la actividad de unión y/o afinidad de un fragmento de Fc a FcRn a pH 6 en comparación con FcWT y también tuvo poco o ningún efecto sobre la disociación a pH 7,4. Por tanto, estos datos apuntan a que una parte del bucle 10, es decir, de la posición 382 a 386, 387 o 388 (numeración EU), contiene sitios particularmente favorables para hacer inserciones que pueden potenciar la actividad de unión y/o afinidad por FcRn a pH 6.

35 **Ejemplo 11: Selección del fragmento de Fc variante por presentación en levaduras**

- Para obtener un grupo diferente de polipéptidos Fc variantes, se realizó una selección usando presentación en levaduras. Para preparar las colecciones para el cribado en levaduras, se usaron tres colecciones preparadas previamente como puntos de partida. Una de estas era la colección L5, que se describe anteriormente. Véase la figura 2 y el ejemplo 2. Las otras dos colecciones tenían inserciones en exactamente el mismo sitio que la colección L5 y se prepararon usando los mismos métodos generales que se usaron para preparar la colección L5, pero el formato de las inserciones difería en que la colección L5 codificaba inserciones con seis aminoácidos aleatorizados mientras que las colecciones L-8 y L-10 codificaban inserciones con ocho y diez aminoácidos aleatorizados, respectivamente. Específicamente, estas colecciones codificaban inserciones con los siguientes formatos: colección L-8, GGC(19R)₈CGG (SEQ ID NO: 88); y colección L-10, GGC(19R)₁₀CGG (SEQ ID NO: 89). Estas inserciones, como las de la colección L5, están entre la "N" a la posición 169 y la "G" en la posición 170 de acuerdo con el

esquema de numeración de la figura 2. El "(19R)₈" y "(19R)₁₀" indican ocho y diez, respectivamente, aminoácidos aleatorizados, que pueden ser cualquier aminoácido distinto de cisteína.

Las colecciones L5, L-8 y L-10 se digirieron con SacII y NotI, y los fragmentos resultantes, que codificaban los fragmentos de Fc variantes, se purificaron y ligaron en un vector apropiado para la expresión tanto en *Escherichia coli* como en *Saccharomyces cerevisiae*. El vector también codificaba una marca de HA (una secuencia peptídica corta (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO: 575) de hemaglutinina de gripe humana) en el mismo marco con la inserción, que se usó para confirmar que las regiones Fc se presentaban en la superficie de las células de levadura. Estas tres nuevas colecciones se introdujeron en *E. coli*, específicamente, en células de *E. coli* supercompetentes XL1 blue. Se usó el ADN de aproximadamente 5×10^8 transformantes de *E. coli* para transformar aproximadamente $1-2 \times 10^9$ células de *S. cerevisiae* usando el método convencional de acetato de litio. Un cultivo durante una noche de *S. cerevisiae* se diluyó hasta una DO₆₀₀ de 0,2-0,3 en 100 mililitros de medio glucosado con peptona de extracto de levadura (que contiene 20 g/l de peptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura, glucosa al 2 % (YPD)) y se cultivó a 30 °C agitando a 300 revoluciones por minutos (r.p.m.) hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 1,0-2,0. Las células entonces se lavaron con 30 mililitros de agua y con 30 mililitros de LiOAc 100 mM. Para cada colección, se añadió una mezcla de transformación que contenía LiOAc 1 M, PEG al 50 %, ADN transportador monocatenario, agua y 25 µg del ADN de la colección, a las células. Cada transformación se sometió a choque térmico a 42 °C durante 45 minutos. Las células se sedimentaron y después se cultivaron en 50 mililitros de medio YPD a 30 °C durante 1 hora. Las células se sedimentaron de nuevo y se lavaron con 30 mililitros en medio SD-leu (14,7 g/l de citrato de sodio, 4,29 g/l de ácido cítrico, dextrosa al 2 %, 6,7 g/l de base nitrogenada de levadura (YNB), 1,6 g/l de complementos de medio de agotamiento sintético de levadura sin leucina (Sigma, Y1376)). Las células entonces se resuspendieron en 10 mililitros de medio SD-leu. Los 10 mililitros de células transformadas se inocularon entonces en 300 mililitros de medio SD-leu y se cultivaron durante una noche a 30 °C.

La inducción de la expresión de los fragmentos de Fc variantes en los transformantes de levadura se consiguió por inoculación de una alícuota de un cultivo durante una noche (aproximadamente 10^8 células) en medio de inducción (5,4 g/l de Na₂HPO₄, 8,56 g/l de NaH₂PO₄, galactosa al 2 %, 6,7 g/l de YNB, y 1,6 g/l de complementos de medio de agotamiento sintético de levadura sin leucina (Sigma, Y1376)) y cultivando las células durante aproximadamente 48 horas a 20 °C.

Estas células inducidas se centrifugaron y resuspendieron en tampón de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (+BSA al 0,5 %) a pH 7,4. Después, se incubaron $0,5-1 \times 10^8$ células inducidas durante una hora con FcRn biotinilado (biotina-FcRn) 1 µM. Las células entonces se lavaron y se incubaron con 2 µg/ml de estreptavidina marcada (estreptavidina (SA)-Alexa Fluor® 647 (número de catálogo S32357, Invitrogen)) durante 15 minutos. Las células entonces se lavaron e incubaron con microesferas anti-Cy5/anti-Alexa Fluor® 647 (número de catálogo 130-091-395, MACS Miltenyi Biotec) durante 15 minutos. Las células se lavaron y separaron usando columnas de LS (número de catálogo 130-042-401, MACS Miltenyi Biotec) y una unidad de separación QuadroMACS® (número de catálogo 130-091-051, MACS Miltenyi Biotec). Se recogieron alícuotas de las fracciones de antes de la columna, flujo continuo, lavados y elución para el análisis FACS. El flujo continuo y los lavados se recogieron como nuestra población reducida, que contenía células que expresan polipéptidos Fc variantes que se unían a FcRn con muy baja afinidad a pH 7,4.

Esta población reducida de células entonces se cultivó durante una noche a 30 °C en medio SD-leu. Las células entonces se indujeron durante aproximadamente 48 horas a 20 °C en medio de inducción como se describe anteriormente. Las posteriores etapas de lavado e incubación se realizaron en tampón MES (MES 20 mM, NaCl 137 mM, BSA al 0,5 %) a pH 5,5. Las células inducidas se incubaron en hielo con biotina-FcRn 250 nM durante una hora. Posteriormente se añadió SA-Alexa Fluor® 647 (2 µg/ml) y anti-HA-FITC (1 µg/ml) y, después de lavarse y ponerse a través de un tamizador celular, las células se sometieron a análisis FACS a pH 5,5. Las ventanas de adquisición se establecieron para recoger células que mostraban una señal robusta tanto para FITC como para Alexa Fluor®. Estas células entonces se cultivaron durante una noche a 30 °C en medio SD-leu y después se indujeron durante aproximadamente 48 hora a 20 °C en medio de inducción. Después, en una segunda ronda, las células inducidas se incubaron en hielo con biotina-FcRn 25 nM durante una hora, y se repitieron las etapas de marcaje, lavado, tamizado, FACS, cultivo e inducción, como se describe anteriormente. Finalmente, en una tercera ronda, las células inducidas se incubaron en hielo con biotina-FcRn 5 nM durante una hora, seguido de las etapas de marcaje, lavado, tamizado, FACS y cultivo descritas anteriormente. Por tanto, el resultado final fue una población de células que expresaban fragmento de Fc que podían unirse a FcRn con mayor afinidad que un fragmento de Fc de tipo silvestre podía a pH 5,5

Esta población de células se sembró en placas, y se seleccionaron 500 colonias de la colección L5 y 400 colonias de cada una de las colecciones L-8 y L-10 para análisis adicional. Cada una de estas colonias individuales se cultivó a 30 °C durante una noche en medio SD-leu como se describe anteriormente. Las secuencias de las inserciones en cada uno de estos aislados se determinaron a partir del ADN plasmídico de levadura. En todas, se encontraron 317, 265 y 313 secuencias únicas entre estos aislados en cada una de las colecciones L5, L-8 y L-10, respectivamente. Las células entonces se indujeron a 20 °C durante 48 horas en el medio de inducción descrito anteriormente. Las etapas posteriores de lavado e incubación se realizaron en paralelo en tampón MES (MES 20 mM, NaCl 137 mM, BSA al 0,5 %) a pH 5,5 y en tampón PBS (+BSA al 0,5 %) a pH 7,4. Se incubaron aproximadamente 5×10^5 células por muestra con biotina-FcRn 250 nM y 1 µg/ml de anti-HA-FITC durante 1 hora. Después, las células se lavaron e

incubaron con 2 µg/ml SA-Alexa-Fluor® 647 durante 15 minutos. Las células se lavaron y analizaron para la unión mediante FACS para determinar si se unían a FcRn fuertemente a pH 5,5 y débilmente a pH 7,4. Las líneas celulares individuales que mostraban las máximas señales para la unión a FcRn a pH 5,5, junto con una baja señal para la unión a FcRn a pH 7,4 y pocos o ningún resto de metionina o triptófano, se eligieron de cada colección para análisis adicional. Estos aislados seleccionados incluían 158, 59 y 50 líneas celulares de L5, L-8 y L-10, respectivamente, y las secuencias de las inserciones en estos aislados se muestran en la tabla 8 a continuación. (Obsérvese que el clon llamado 5y-37 no se incluyó en el análisis adicional porque no se volvió a clonar satisfactoriamente en el vector apropiado.)

Tabla 8: Secuencias de polipéptidos Fc variante que se unen con alta afinidad a pH 5,5 y baja afinidad a pH 7,4

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
5y-1	GGCHFDIMNCGG (SEQ ID NO: 90)	8y-1	GGCKTWQLLIFCGG (SEQ ID NO: 248)	10y-1	GGCAFEFSSAFNCGG (SEQ ID NO: 307)
5y-2	GGCVIDFFGCGG (SEQ ID NO: 91)	8y-2	GGCEQNWTLTYMCGG (SEQ ID NO: 249)	10y-2	SGCQTMLTAEGEWCGG (SEQ ID NO: 308)
5y-3	GGCDIMIFECGG (SEQ ID NO: 92)	8y-3	SGCWPSPYIFPCGG (SEQ ID NO: 250)	10y-3	GGCVMDLWPDLEICGG (SEQ ID NO: 309)
5y-4	GGCMTEFAICGG (SEQ ID NO: 93)	8y-4	GGCWEALQVNNCGG (SEQ ID NO: 251)	10y-4	GGCQPLFDDHDTWCGG (SEQ ID NO: 310)
5y-5	GGCIQYWQFCGG (SEQ ID NO: 94)	8y-5	CGCQAMVVEDLCG (SEQ ID NO: 252)	10y-5	GGCPFELVMSDEQCGG (SEQ ID NO: 311)
5y-6	GGCPFSWAFCGG (SEQ ID NO: 95)	8y-6	GGCPLEWPRISCGG (SEQ ID NO: 253)	10y-6	SGCGHGMQMDSVFCGG (SEQ ID NO: 312)
5y-7	GGCGFAFMYCGG (SEQ ID NO: 96)	8y-7	GGCEPWIMEANCGG (SEQ ID NO: 254)	10y-7	SGCDETQSAIWYFCGG (SEQ ID NO: 313)
5y-8	GGCPVLLFNCGG (SEQ ID NO: 97)	8y-8	GGCPWDQHINFCGG (SEQ ID NO: 255)	10y-8	GGCREPEQYWTWVCGG (SEQ ID NO: 314)
5y-9	GGCPFTWTKCGG (SEQ ID NO: 98)	8y-9	GGCPWYIQMDHCGG (SEQ ID NO: 256)	10y-9	SGCQEKKDLWYECGG (SEQ ID NO: 315)
5y-10	GGCYLYWQFCGG (SEQ ID NO: 99)	8y-10	SGCQPWEISYFCGG (SEQ ID NO: 257)	10y-10	SGCGQDNDLPWEWCGG (SEQ ID NO: 316)
5y-11	GGCVINMFPCGG (SEQ ID NO: 100)	8y-11	GGCPVMFLDPRCGG (SEQ ID NO: 258)	10y-11	GGCVFQLSFSRSDCGG (SEQ ID NO: 317)
5y-12	GGCPFTWNTCGG (SEQ ID NO: 101)	8y-12	GGCSSDVLMIFCGG (SEQ ID NO: 259)	10y-12	SGCAFDMIWFEGVCGG (SEQ ID NO: 318)
5y-13	GGCPFQIGECGG (SEQ ID NO: 102)	8y-13	GGCVDEMVIYHCGG (SEQ ID NO: 260)	10y-13	SGCAFYWPWEHSCGG (SEQ ID NO: 319)
5y-14	GGCLDIWMCGG (SEQ ID NO: 103)	8y-14	GGCPFMVNLYSCGG (SEQ ID NO: 261)	10y-14	GGCQLSIILTGLPCGG (SEQ ID NO: 320)
5y-15	GGCMFVFACGG (SEQ ID NO: 104)	8y-15	GGCESDTMWYFCGG (SEQ ID NO: 262)	10y-15	GGCGMLEWSGLQFCGG (SEQ ID NO: 321)
5y-16	GGCVMEQLWCGG (SEQ ID NO: 105)	8y-16	GGCRSDEIIFCGG (SEQ ID NO: 263)	10y-16	SGCHEKALTYWEFCGG (SEQ ID NO: 322)
5y-17	GGCFKEYTWCGG (SEQ ID NO: 106)	8y-17	GGCPWDLPLPCGG (SEQ ID NO: 264)	10y-17	GGCFENMQVWYNECGG (SEQ ID NO: 323)
5y-18	GGCPKDYHICGG (SEQ ID NO: 107)	8y-18	GGCPWAMELVHCGG (SEQ ID NO: 265)	10y-18	GGCPEWENQILLFCGG (SEQ ID NO: 324)
5y-19	GGCEVMVFPCGG (SEQ ID NO: 108)	8y-19	SGCTASMYWEYCGG (SEQ ID NO: 266)	10y-19	SGCESWQRDMNYFCGG (SEQ ID NO: 325)
5y-20	GGCVFNTVFCGG (SEQ ID NO: 109)	8y-20	GGCGLYMDPPYYGG (SEQ ID NO: 267)	10y-20	SGCNDQFPMYYLFCGG (SEQ ID NO: 326)
5y-21	GGCNLPQEWCGG (SEQ ID NO: 110)	8y-21	GGCPVMVMEPYCGG (SEQ ID NO: 268)	10y-21	GGCFEDMALQPTQCGG (SEQ ID NO: 327)
5y-22	GGCMIAPMYCGG (SEQ ID NO: 111)	8y-22	GGCQTEFILEFCGG (SEQ ID NO: 269)	10y-22	SGCKGPWQFEFLVCGG (SEQ ID NO: 328)
5y-23	GGCMMLYPMCGG (SEQ ID NO: 112)	8y-23	SGCAFQAHGAMCGG (SEQ ID NO: 270)	10y-23	GGCEAFSMKFNDFCGG (SEQ ID NO: 329)
5y-24	GGCIIGPFLCGG (SEQ ID NO: 113)	8y-24	GGCPDFMFRMNCGG (SEQ ID NO: 271)	10y-24	GGCVQPAIAMWPFCGG (SEQ ID NO: 330)
5y-25	GGCTGMVFFCGG (SEQ ID NO: 114)	8y-25	SGCSVWFDTISCGG (SEQ ID NO: 272)	10y-25	GGCTDQGRFVLYECGG (SEQ ID NO: 331)

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
5y-26	GGCLMYKNVCGG (SEQ ID NO: 115)	8y-26	GGCPWSMEISNCGG (SEQ ID NO: 273)	10y-26	GGCPVQEFLWGVYCGG (SEQ ID NO: 332)
5y-27	GGCAFGIMWCGG (SEQ ID NO: 116)	8y-27	GGCPTWNWEITCGG (SEQ ID NO: 274)	10y-27	GGCSNSWEWTLYACGG (SEQ ID NO: 333)
5y-28	GGCRHRKKWCGG (SEQ ID NO: 117)	8y-28	SGCPWDMHIVDCGG (SEQ ID NO: 275)	10y-28	SGCHGLVEWGYMACGG (SEQ ID NO: 334)
5y-29	GGCFMGIWQCGG (SEQ ID NO: 118)	8y-29	SGCFPWEPAYFCGG (SEQ ID NO: 276)	10y-29	SGCEAFGLIFEDFCGG (SEQ ID NO: 335)
5y-30	GGCPSLPQFCGG (SEQ ID NO: 119)	8y-30	GGCPFGWNVHFCGG (SEQ ID NO: 277)	10y-30	GGCANPEFQMWFYFCGG (SEQ ID NO: 336)
5y-31	GGCPSVFTWCGG (SEQ ID NO: 120)	8y-31	GGCPWHMEVNECGG (SEQ ID NO: 278)	10y-31	SGCGYEVPIPLFTCGG (SEQ ID NO: 337)
5y-32	GGCQEYWEFCGG (SEQ ID NO: 121)	8y-32	GGCPFALGMGECGG (SEQ ID NO: 279)	10y-32	GGCWFAQFAWRATCGG (SEQ ID NO: 338)
5y-33	GGCQWPTEFCGG (SEQ ID NO: 122)	8y-33	GGCMFPFMLSNCGG (SEQ ID NO: 280)	10y-33	GGCGFELNMISQYCGG (SEQ ID NO: 339)
5y-34	GGCIKFFDWCGG (SEQ ID NO: 123)	8y-34	GGCAFAQFMPAHCGG (SEQ ID NO: 281)	10y-34	GGCEPFELRFYHEGCGG (SEQ ID NO: 340)
5y-35	GGCEMSFFLCGG (SEQ ID NO: 124)	8y-35	GGCQIQGFTEFCGG (SEQ ID NO: 282)	10y-35	GGCPFQLVWSPAFCGG (SEQ ID NO: 341)
5y-36	GGCHSEVEYCGG (SEQ ID NO: 125)	8y-36	GGCPMGIILDLCGG (SEQ ID NO: 283)	10y-36	SGCAWEIKGIWCGG (SEQ ID NO: 342)
5y-37	GGCWEHPHYCGG (SEQ ID NO: 126)	8y-37	GGCLMLEPTVTCGG (SEQ ID NO: 284)	10y-37	SGCSSIQSWRLWLCGG (SEQ ID NO: 343)
5y-38	GGCETYWLFCGG (SEQ ID NO: 127)	8y-38	GGCGKNEVAMFCGG (SEQ ID NO: 285)	10y-38	GGCGVMQVLNRAHCGG (SEQ ID NO: 344)
5y-39	GGCRVPYPSCGG (SEQ ID NO: 128)	8y-39	GGCSFLLFIANCGG (SEQ ID NO: 286)	10y-39	RGCQVKYYMGEGDCGG (SEQ ID NO: 345)
5y-40	GGCGWPFVMCGG (SEQ ID NO: 129)	8y-40	GGCDVEKIMIFCGG (SEQ ID NO: 287)	10y-40	GGCPVWIPFHWECCGG (SEQ ID NO: 346)
5y-41	GGCMLFLESCGG (SEQ ID NO: 130)	8y-41	GGCFPMTPWGLCGG (SEQ ID NO: 288)	10y-41	SGCLLWQQSMLLFCGG (SEQ ID NO: 347)
5y-42	GGCFHVHVRWCGG (SEQ ID NO: 131)	8y-42	SGCDWYLEWWSGNCGG (SEQ ID NO: 289)	10y-42	SGCEQQWSWRLYLCCGG (SEQ ID NO: 348)
5y-43	GGCVWEQEHC CGG (SEQ ID NO: 132)	8y-43	GGCGVEIMFHGCGG (SEQ ID NO: 290)	10y-43	GGCSVQSTWQLWACGG (SEQ ID NO: 349)
5y-44	GGCILHFKDCGG (SEQ ID NO: 133)	8y-44	GGCMDGLHLYFCGG (SEQ ID NO: 291)	10y-44	SGCKYPIFWDITDCGG (SEQ ID NO: 350)
5y-45	GGCHFVVFQCGG (SEQ ID NO: 134)	8y-45	SGCPIFIDYFCGG (SEQ ID NO: 292)	10y-45	SGCVEYQYQMVYFCGG (SEQ ID NO: 351)
5y-46	GGCVFEVMQCGG (SEQ ID NO: 135)	8y-46	GGCAVWIFSDACGG (SEQ ID NO: 293)	10y-46	GGCTDQRWFVLYECGG (SEQ ID NO: 352)
5y-47	GGCMTEFSWCGG (SEQ ID NO: 136)	8y-47	GGCPWSLHIQCCGG (SEQ ID NO: 294)	10y-47	GGCPFWQEWHLSCGG (SEQ ID NO: 353)
5y-48	GGCEGNMRFCGG (SEQ ID NO: 137)	8y-48	SGCAFSMLFINCGG (SEQ ID NO: 295)	10y-48	SGCYMGYMHIAECGG (SEQ ID NO: 354)
5y-49	GGCKGHMWCYCGG (SEQ ID NO: 138)	8y-49	SGCLPWELYMFCGG (SEQ ID NO: 296)	10y-49	GGCFMGSFSLVYGC GG (SEQ ID NO: 355)
5y-50	GGCEAYWQFCGG (SEQ ID NO: 139)	8y-50	SGCPFTINFYTCGG (SEQ ID NO: 297)	10y-50	SGCPWGFMPISYCGG (SEQ ID NO: 356)
5y-51	GGCVFSRWF CGG (SEQ ID NO: 140)	8y-51	GGCPIWFTWSTCGG (SEQ ID NO: 298)		
5y-52	GGCMMPFWPCGG (SEQ ID NO: 141)	8y-52	GGCQIQVNPYCGG (SEQ ID NO: 299)		
5y-53	GGCIFQFEMCGG (SEQ ID NO: 142)	8y-53	GGCAFQIEFLMCGG (SEQ ID NO: 300)		
5y-54	GGCKRQMWCYCGG (SEQ ID NO: 143)	8y-54	GGCAWEIRILGCGG (SEQ ID NO: 301)		
5y-55	GGCKTPNPWC GG (SEQ ID NO: 144)	8y-55	GGCPYQLVIMWCGG (SEQ ID NO: 302)		
5y-56	GGCKAFYPWCGG	8y-56	GGCMFAMHVFGCGG		

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
	(SEQ ID NO: 145)		(SEQ ID NO: 303)		
5y-57	GGCKMYQYDCGG (SEQ ID NO: 146)	8y-57	SGCTVMYTLQIFGG (SEQ ID NO: 304)		
5y-58	GGCYPDNMFCGG (SEQ ID NO: 147)	8y-58	SGCAHQVYWAFCGG (SEQ ID NO: 305)		
5y-59	GGCQVKIFWCGG (SEQ ID NO: 148)	8y-59	GGCPNFFNFWFCGG (SEQ ID NO: 306)		
5y-60	GGCSIPQEWCGG (SEQ ID NO: 149)				
5y-61	GGCKMYQATCGG (SEQ ID NO: 150)				
5y-62	GGCQYERWHCGG (SEQ ID NO: 151)				
5y-63	GGCRFQHQWCGG (SEQ ID NO: 152)				
5y-64	GGCQNMFWQCGG (SEQ ID NO: 153)				
5y-65	GGCVMEIVFCGG (SEQ ID NO: 154)				
5y-66	GGCILNFMCGG (SEQ ID NO: 155)				
5y-67	GGCMHMDYFCGG (SEQ ID NO: 156)				
5y-68	GGCQVMVLPCGG (SEQ ID NO: 157)				
5y-69	GGCLFDWPSCGG (SEQ ID NO: 158)				
5y-70	GGCKMYHQTCGG (SEQ ID NO: 159)				
5y-71	GGCQWLYESCGG (SEQ ID NO: 160)				
5y-72	GGCFTNFWLGG (SEQ ID NO: 161)				
5y-73	GGCWEPHWCGG (SEQ ID NO: 162)				
5y-74	GGCAFAMLQCGG (SEQ ID NO: 163)				
5y-75	GGCMYQRQAWCGG (SEQ ID NO: 164)				
5y-76	GGCPFLWAECGG (SEQ ID NO: 165)				
5y-77	GGCMFDHKVCGG (SEQ ID NO: 166)				
5y-78	GGCMEIFNFCGG (SEQ ID NO: 167)				
5y-79	GGCVMERLWCGG (SEQ ID NO: 168)				
5y-80	GGCEYYWQFCGG (SEQ ID NO: 169)				
5y-81	GGCPFSWDQCGG (SEQ ID NO: 170)				
5y-82	GGCIEYFSWCGG (SEQ ID NO: 171)				
5y-83	GGCVFEIMKCGG (SEQ ID NO: 172)				
5y-84	GGCESPQYFCGG (SEQ ID NO: 173)				
5y-85	GGCHHDFEWCGG (SEQ ID NO: 174)				
5y-86	GGCMFPFSWCGG (SEQ ID NO: 175)				

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
5y-87	GGCNTVLQECGG (SEQ ID NO: 176)				
5y-88	GGCVFDIMLCGG (SEQ ID NO: 177)				
5y-89	GGCMYQQPWCGG (SEQ ID NO: 178)				
5y-90	GGCKKLYHYCGG (SEQ ID NO: 179)				
5y-91	GGCPHWPFCGG (SEQ ID NO: 180)				
5y-92	GGCPIFPMICGG (SEQ ID NO: 181)				
5y-93	GGCMSKDLWCGG (SEQ ID NO: 182)				
5y-94	GGCMFQMGVCGG (SEQ ID NO: 183)				
5y-95	GGCYEWPSYCGG (SEQ ID NO: 184)				
5y-96	GGCQMLYMDCGG (SEQ ID NO: 185)				
5y-97	GGCTVQVFFCGG (SEQ ID NO: 186)				
5y-98	GGCITFPMICGG (SEQ ID NO: 187)				
5y-99	GGCVMYWEYCGG (SEQ ID NO: 188)				
5y-100	GGCMWEVLHCGG (SEQ ID NO: 189)				
5y-101	GGCMQERSWCGG (SEQ ID NO: 190)				
5y-102	GGCVFETIQCGG (SEQ ID NO: 191)				
5y-103	GGCQWANSYCGG (SEQ ID NO: 192)				
5y-104	GGCKFGQWYCGG (SEQ ID NO: 193)				
5y-105	GGCVFDQMWCGG (SEQ ID NO: 194)				
5y-106	GGCEVMIFNCGG (SEQ ID NO: 195)				
5y-107	GGCESPMFVCGG (SEQ ID NO: 196)				
5y-108	GGCITMFQNCGG (SEQ ID NO: 197)				
5y-109	GGCVFERMFCGG (SEQ ID NO: 198)				
5y-110	GGCGFEIFMCG (SEQ ID NO: 199)				
5y-111	GGCLLQFTGCGG (SEQ ID NO: 200)				
5y-112	GGCHFQIFQCGG (SEQ ID NO: 200)				
5y-113	GGCPFDWDKCGG (SEQ ID NO: 202)				
5y-114	GGCVTPLPFCG (SEQ ID NO: 203)				
5y-115	GGCYMYMDYCGG (SEQ ID NO: 204)				
5y-116	GGCMFEWYVCGG (SEQ ID NO: 205)				
5y-117	GGCPFTWRICGG				

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
	(SEQ ID NO: 206)				
5y-118	GGCENDWKMC GG (SEQ ID NO: 207)				
5y-119	GGCAFEFIYCGG (SEQ ID NO: 208)				
5y-120	GGCPVAVFMC GG (SEQ ID NO: 209)				
5y-121	GGCHFDIFDC GG (SEQ ID NO: 210)				
5y-122	GGCPPENMF CGG (SEQ ID NO: 211)				
5y-123	GGCPFQMGE CGG (SEQ ID NO: 212)				
5y-124	GGCISGFFWCGG (SEQ ID NO: 213)				
5y-125	GGCPHFHQVCGG (SEQ ID NO: 214)				
5y-126	GGCMFQIINCGG (SEQ ID NO: 215)				
5y-127	GGCQYFLPCGG (SEQ ID NO: 216)				
5y-128	GGCHFAVLDCGG (SEQ ID NO: 217)				
5y-129	GGCWNVMGLCGG (SEQ ID NO: 218)				
5y-130	GGCYTTHEL CGG (SEQ ID NO: 219)				
5y-131	GGCLYKQVDCGG (SEQ ID NO: 220)				
5y-132	GGCVFSALWCGG (SEQ ID NO: 221)				
5y-133	GGCPFQFQTCGG (SEQ ID NO: 222)				
5y-134	GGCAFLMMDCGG (SEQ ID NO: 223)				
5y-135	GGCEVWYEF CGG (SEQ ID NO: 224)				
5y-136	GGCAFDIGVCGG (SEQ ID NO: 225)				
5y-137	GGCLSPLMWCGG (SEQ ID NO: 226)				
5y-138	GGCPFSWVICGG (SEQ ID NO: 227)				
5y-139	GGCMLMFQGC GG (SEQ ID NO: 228)				
5y-140	GGCQPNHWLC GG (SEQ ID NO: 229)				
5y-141	GGCIDTYVWCGG (SEQ ID NO: 230)				
5y-142	GGCHFHLMF CGG (SEQ ID NO: 231)				
5y-143	GGCQMIFSTCGG (SEQ ID NO: 232)				
5y-144	GGCKMYQPDCGG (SEQ ID NO: 233)				
5y-145	GGCMWGVFKCGG (SEQ ID NO: 234)				
5y-146	GGCGLFGQSCGG (SEQ ID NO: 235)				
5y-147	GGCQFNFPWCGG (SEQ ID NO: 236)				

Colección L5		Colección L-8		Colección L-10	
Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)	Clon	Sec. de inserción (SEQ ID NO)
5y-148	GGCNIAYPWCGG (SEQ ID NO: 237)				
5y-149	GGCKTIPIFCGG (SEQ ID NO: 238)				
5y-150	GGCQMELFLCGG (SEQ ID NO: 239)				
5y-151	GGCLGAFYWCGG (SEQ ID NO: 240)				
5y-152	GGCPFNFASCGG (SEQ ID NO: 241)				
5y-153	GGCQFDILWCGG (SEQ ID NO: 242)				
5y-154	GGCYTTHELCCG (SEQ ID NO: 243)				
5y-155	GGCQQRWRYCGG (SEQ ID NO: 244)				
5y-156	GGCLWVDEYCGG (SEQ ID NO: 245)				
5y-157	GGCGMLGWFCGG (SEQ ID NO: 246)				
5y-158	GGCWEQHYLCGG (SEQ ID NO: 247)				

Los clones individuales seleccionados de cada colección se combinaron y se aisló el ADN usando el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II (D2004, Zymo Research). Se realizó PCR sobre el ADN combinado usando cebador directo (5' GGA AAA GTC GAC TAG ACC ACC ATG GA 3' (SEQ ID NO: 357)) y cebador inverso (5' CTT TGC GGC CGC TCA TTA TTT 3' (SEQ ID NO: 358)). Se usó un kit esencial de PCR (Roche, n.º de catálogo 11 578 553 001) con las siguientes condiciones de reacción: 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 90 segundos y finalmente 72 °C durante 10 minutos. La reacción de PCR y un vector de expresión de mamífero se digirieron durante una noche a 37 °C con las enzimas de restricción Sall y NotI (New England Biolabs). El ADN digerido se purificó en gel usando el kit de purificación de gel QIAquick (28704, Qiagen). El ADN del vector digerido y los productos de PCR se ligaron usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs) y se incubaron a 16 °C durante una noche. El ADN ligado se usó para transformar células de *E. coli* ultracompetentes XL10-gold (n.º 200315, Stratagene) y se seleccionaron clones individuales. El ADN plasmídico de un clon de *E. coli* que contenía ADN que codificaba cada polipéptido Fc variante seleccionado se introdujo en células de mamífero 293-6E. Específicamente, se sembraron células 293-6E a 5×10^4 células/pocillo en placas de microvaloración de fondo plano de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina y se incubaron durante una noche a 37 °C. Después, se transfectaron 200 ng de ADN plasmídico en las células usando el reactivo de transfección Fugene® HD (n.º E2312, Promega) y se incubaron durante una noche a 37 °C. El siguiente día, se cambió el medio de crecimiento a medio sin suero que contenía triptona al 0,5 %. Se recogió el medio acondicionado después de otros 6 días de crecimiento a 37 °C. El medio acondicionado, que contenía los fragmentos de Fc variantes, se ensayó entonces para la unión a FcRn usando la tecnología ForteBio descrita en el ejemplo 4. Se muestran curvas de asociación y disociación a pH 6 y 7,4, respectivamente, de los fragmentos de Fc variantes que tienen los perfiles de unión más favorables en la figura 7.

La figura 7 muestra perfiles de asociación y disociación para la unión de FcRn a pH 6 y pH 7,4, respectivamente, de los 28 mejores fragmentos de Fc variantes de la colección en levadura L5, así como un fragmento de Fc de tipo silvestre (FcWT) y la figura 8 muestra los perfiles de unión a FcRn para los 18 mejores fragmentos de Fc variantes seleccionados de las colecciones en levadura L-8 y L-10. Todos los fragmentos de Fc variantes de L5 tenían una respuesta máxima mucho mayor a pH 6, es decir, mayor actividad de unión, que FcWT. A pH 7,4, todos se disociaban rápidamente, es decir, tenían poca o ninguna actividad de unión, similar a FcWT. Todos los fragmentos de Fc variantes de L-8 y L-10 tuvieron una respuesta máxima mucho mayor a pH 6, es decir, mayor actividad de unión que FcWT. A pH 7,4, todos se disociaron rápidamente, aunque la mayoría mostraron bajos niveles de unión residual no observada en FcWT. Por tanto, todos estos fragmentos de Fc variantes tienen propiedades favorables en comparación con FcWT. Por lo tanto, pueden usarse satisfactoriamente inserciones de péptidos con diferentes longitudes para potenciar la actividad de unión a FcRn a pH 6 mientras se conserva la rápida disociación de FcRn a pH 7,4 con poca o ninguna unión residual.

Ejemplo 12: Caracterización *in vivo* de fragmentos de Fc variantes seleccionados en levadura

Para determinar si los anticuerpos que contienen los fragmentos de Fc variantes identificados en el cribado de levaduras descrito anteriormente tienen propiedades farmacocinéticas (PK) mejoradas *in vivo*, se ensayó un anticuerpo X sin modificar (que es un anticuerpo IgG2 humana anti-IL-23 humana) y versiones variantes de

anticuerpo X que contiene fragmentos de Fc variantes *in vivo* en macacos cangrejeros para definir los parámetros farmacocinéticos. Se seleccionó anticuerpo X como anticuerpo apropiado en el que ensayar los parámetros farmacocinéticos de los fragmentos de Fc variantes porque se sabía que tenía un perfil pK lineal y porque se sabía que IL-23 se expresaba a bajos niveles *in vivo*. Por tanto, se esperaba que los efectos relacionados con la diana sobre los parámetros PK fueran mínimos, haciendo más fácil detectar los efectos pK debido a los fragmentos de Fc variantes.

Se prepararon seis anticuerpos IgG2 variantes llamados (X-5y-8, X-5y-132, X-5y-38, X-5y-91, X-5y-119 y X-5y-127). Estos anticuerpos IgG2 tenían las mismas inserciones en las mismas posiciones que los fragmentos de Fc de IgG1 variantes 5y-8, 5y-132, 5y-38, 5y-91, 5y-119 y 5y-127, respectivamente. Se usó un plásmido que contenía ADN que codifica la cadena pesada de anticuerpo X como molde para cinco reacciones de PCR hechas usando los siguientes cebadores: para X-5y-8, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT CCG GTT CTG CTG TTC AAC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 380), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GAA GAG CAG AAC CCG ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC -3' (SEQ ID NO: 381); para X-5y-132, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GGT TTC TCT GCT CTG TGG TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 382), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA CCA CAG AGC AGA GAA AAC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 383); para X-5y-38, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GAA ACT TAC TGG TTG TTC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 384), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GAA CAA CCA GTA AGT TTC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 385); para X-5y-91, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 386), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA TTC GAA CCG CCA ATG CCG ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 387); para X-5y-119, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT GCT TTC GAA TTC ATC TAC TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 388), e inverso, 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA GTA GAT GAA TTC GAA AGC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC -3' (SEQ ID NO: 389); y para X-5y-127, directo, 5'-GAG TGG GAG AGC AAT GGT GGT TGT CAG TAC TTC TTG CCG TGT GGT GGT GGG CAG CCG GAG AAC-3' (SEQ ID NO: 390), e inverso 5'-GTT CTC CGG CTG CCC ACC ACC ACA CCG CAA GAA GTA CTC ACA ACC ACC ATT GCT CTC CCA CTC-3' (SEQ ID NO: 391). Se usó el protocolo del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quikchange (Stratagene, 200518). La mezcla de reacción era dNTP 200 nM, cebadores 100 nM, 1 ng de molde de ADN, 1 µl de ADN polimerasa y agua en un volumen total de 50 µl. La reacción se procesó a 95 °C durante 30 segundos, después 16 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 60 segundos, 68 °C durante 6 minutos, seguido de 68 °C durante 10 minutos. Después se añadió 1 µl de DpnI y la reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se usaron 2 µl de la mezcla para transformar 30 µl de células supercompetentes XL1 blue (Stratagene) a 42 °C durante 45 segundos. Después de ello, se cargaron 0,5 ml de SOC y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora en un agitador a 300 r.p.m. Las células transformadas se extendieron en placas de agar de LB-ampicilina y se incubaron a 37 °C durante una noche. Se cogieron colonias individuales y se preparó ADN plasmídico y se secuenció para asegurar que los aislados elegidos tuvieran la secuencia de ADN esperada.

Se prepararon anticuerpos esencialmente de la misma manera que se describe anteriormente para fragmentos de Fc, excepto que se transfectaron células hospedadoras de mamífero con ADN que codifican tanto la cadena pesada de IgG2, incluyendo una parte que codifica un fragmento de Fc variante o de control, como la cadena ligera de anticuerpo X. Las células hospedadoras se incubaron en condiciones apropiadas para la expresión de los anticuerpos, y los anticuerpos se recuperaron del medio de cultivo, se purificaron como se describe anteriormente y se usaron para los siguientes experimentos.

Macacos cangrejeros (n=2/grupos) recibieron una única dosis intravenosa de una versión sin modificar o una versión variante de anticuerpo X a una dosis de 1 mg/kg y se hizo un seguimiento durante una fase en vida de 8 semanas. El anticuerpo X-5-112, que se ensayó previamente, se usó como control, así como el propio anticuerpo X. Se recogieron muestras de sangre en puntos temporales especificados a lo largo del curso del experimento. Se recogieron muestras antes de la dosis 0,25, 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 168, 240, 336, 408, 504, 576, 672, 744, 840, 1008, 1176 y 1344 horas después de la dosis. Los anticuerpos se detectaron en muestras de sangre y el análisis farmacocinético se realizó esencialmente como se describe anteriormente en el ejemplo 9.

Como se muestra en la figura 9, versiones variantes del anticuerpo X que contienen todos los fragmentos de Fc variantes ensayados demostraron mayores concentraciones de mAb en macacos cangrejeros en la mayoría de puntos temporales de muestreo, incluyendo todos los puntos temporales más allá de 400 horas, en comparación con el anticuerpo X sin modificar. Además, algunas variantes fueron comparables a X-5-112, que se había ensayado previamente, incluyendo X-5y-8, X-5y-127 y X-5y-91.

La tabla 11 a continuación muestra la semivida ($T_{1/2}$), exposición (área bajo a curva (ABC)) y tasa de eliminación (CI) de anticuerpo X y variantes del mismo en cada uno de los macacos cangrejeros en el estudio.

Tabla 11: Valores individuales para la semivida ($T_{1/2}$), exposición (ABC) y eliminación (CI).

Anticuerpo (número de identificación de mono)	$T_{1/2}$ (horas)	ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	CI ($\text{ml}/\text{kg}/\text{h}$)
Anticuerpo X (n.º 201)	269	3356	0,29
Anticuerpo X (n.º 202)	351	3745	0,253
X-5-112 (n.º 203)	469	5843	0,148
X-5-112 (n.º 204)	677	7752	0,099
X-5y-8 (n.º 205)	389	5484	0,168
X-5y-8 (n.º 206)	520	6611	0,13
X-5y-132 (n.º 207)	139	5962	0,167
X-5y-132 (n.º 208)	531	6770	0,127
X-5y-38 (n.º 209)	258	5454	0,178
X-5y-38 (n.º 210)	428	4563	0,199
X-5y-91 (n.º 211)	626	3742	0,213
X-5y-91 (n.º 212)	684	5162	0,151
X-5y-119 (n.º 213)	39	4713	0,212
X-5y-119 (n.º 214)	465	7272	0,12
X-5y-127 (n.º 215)	529	4825	0,176
X-5y-127 (n.º 216)	679	5946	0,132

Todas las variantes mostraron semividas y ABC aumentadas en comparación con las del anticuerpo X en al menos uno de los dos monos a los que se ha inyectado cada uno. En los monos n.º 207 y n.º 213, X-5y-132 y X-5y-119, respectivamente, tuvieron semividas más cortas que el anticuerpo X. Podía interpretarse que esto indicaba que estos monos particulares desarrollaban anticuerpos antifármaco, que daban lugar a eliminación más rápida de los anticuerpos. Lo valores de ABC también fueron mayores que los de anticuerpo X para la mayoría de las variantes ensayadas.

Los datos promediados para estos parámetros farmacocinéticos, que omiten los monos n.º 207 y n.º 213, se muestran en la tabla 12 a continuación. Se incluyen valores de un estudio previo presentado en la tabla 6 anterior para los anticuerpos X y X-5-112, que muestran que los valores son relativamente constantes de un estudio al siguiente.

Tabla 12: Valores medios para la semivida ($T_{1/2}$), exposición (ABC) y eliminación (CI).

Anticuerpo (n)	$T_{1/2}$ (horas)	ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	CI ($\text{ml}/\text{kg}/\text{h}$)
Anticuerpo X (n=2)*	335	3890	0,247
Anticuerpo X (n=2)	310	3550	0,272
X-5-112 (n=2)*	529	7810	0,108
X-5-112 (n=2)	573	6795	0,123
X-5y-8 (n=2)	455	6044	0,149
X-5y-132 (n=1)#	531	6770	0,127
X-5y-38 (n=2)	343	5008	0,185
X-5y-91 (n=2)	655	4452	0,182
X-5y-119 (n=1)#	465	7272	0,12
X-5y-127 (n=2)	604	5386	0,154

*Estos son valores de un estudio previo presentado en el ejemplo 9 y la tabla 6 e incluidos aquí por motivos de comparación.

#Únicamente uno de los dos monos ensayados en este estudio se incluyó porque se sospecha que los anticuerpos antifármaco son la causa de la rápida eliminación observada en el otro mono.

Estos datos muestran que los parámetros farmacocinéticos para anticuerpo X y para X-5-112 son relativamente constantes de un estudio al siguiente. También indican que la semivida y la exposición están aumentadas en todas las variantes ensayadas. Por tanto, estos datos indican en general que la unión aumentada de un fragmento de Fc variante a FcRn a pH 5,5-6,0 (con respecto a un fragmento de Fc de control) y la rápida disociación de FcRn a pH 7,4 se correlacionan con una semivida *in vivo* más larga de un anticuerpo que contiene el fragmento de Fc variante en macacos cangrejeros.

Ejemplo 13: Caracterización *in vivo* de un anticuerpo que contiene Fc variante que tiene un perfil PK no lineal

Para determinar si las propiedades PK de un anticuerpo que tiene un perfil PK no lineal podrían mejorarse por la inserción de uno de los péptidos descritos en la presente memoria, se transfirió la inserción del fragmento de Fc variante Fc-5-112 al anticuerpo Y, un anticuerpo IgG2 humana que tiene un perfil PK no lineal. Esta forma variante del anticuerpo Y, un anticuerpo IgG2 variante llamado Y-5-112, se preparó esencialmente como se describe

anteriormente, excepto que usando diferentes cebadores de PCR apropiados para hacer la alteración requerida en el anticuerpo Y.

Se prepararon anticuerpos como se describe anteriormente en el ejemplo 9. Macacos cangrejeros (n=2/grupo) recibieron una única dosis intravenosa de anticuerpo Y o anticuerpo Y-5-112 a una dosis de 10 mg/kg y se hizo un seguimiento durante una fase en vida de 8 semanas. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosis y 0,083 (5 min), 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312, 336, 384, 432, 480, 528, 576, 624, 672, 720, 768, 816, 864, 912, 960, 1008, 1056, 1104, 1152, 1200, 1248, 1296 y 1344 horas después de la dosis.

Las concentraciones en suero de macaco cangrejero se determinaron usando un ELISA emparezado. Se diluyó un anticuerpo de ratón antihumano en PBS y se añadió a los pocillos de una placa de microvaloración de 96 pocillos. Después de una incubación nominal de 5 °C que dura una noche o hasta tres días, se descartaron los contenidos de los pocillos y se distribuyó un tampón de bloqueo que comprendía bloqueante BLOTTO (Thermo® Scientific) en los pocillos de la placa. Después de una incubación mínima de una hora a temperatura ambiente ambiental (TAA), los pocillos de la placa se vaciaron y se lavaron seis veces con disolución de lavado 1X (imidazol 2 mM, Tween 20 al 0,02 %, EDTA 0,5 mM, NaCl 160 mM, que se vende por KPL, Inc. como una disolución 20X). Las muestras de estudio, los patrones de ensayo y las muestras de control de calidad preparadas en suero de mono al 100 %, se diluyeron 50 veces en bloqueante BLOTTO antes de la adición a los pocillos de la placa. Los contenidos de los pocillos de la placa se mezclaron mientras se incubaba durante 60 minutos en un agitador de placas. A continuación, los pocillos de la placa se lavaron y se añadió anticuerpo de ratón antihumano marcado con peroxidasa de rábano rusticano a los pocillos de la placa. Después de una incubación final de una hora, los pocillos de la placa se lavaron y revelaron usando un componente de disolución de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción colorimétrica resultante se detuvo añadiendo ácido sulfúrico a los pocillos de la placa. Se determinaron las densidades ópticas a longitudes de onda dobles de 450 nm y 650 nm, y el valor obtenido a 650 nm se restó del valor obtenido a 450 nm. La conversión de los valores de DO en concentraciones para las muestras de estudio diluidas se consiguió a través de regresión de los datos usando un modelo logístico con ponderación establecida a 1/Y² en Watson LIMS versión 7.0.0.01.

Como se muestra en la figura 10, el anticuerpo Y tiene un perfil PK bifásico con una fase aproximadamente lineal que se prolonga desde las 0 horas hasta las 216 horas. Después de ello, la concentración de anticuerpo Y descende precipitadamente. El anticuerpo Y-5-112 tiene un perfil similar excepto que la parte lineal gradualmente descendente del perfil se prolonga desde aproximadamente las 0 horas hasta aproximadamente las 432 horas. Por tanto, la inserción en anticuerpo Y-5-112 aparentemente disminuye la pendiente de la parte lineal del perfil PK, aumentando de este modo la exposición global en comparación al anticuerpo Y.

Lista de secuencias

- <110> AMGEN INC.
- <120> Polipéptidos Fc variantes con unión potenciada al receptor de Fc neonatal
- <130> A-1688-WO-PCT
- <140> A asignar
- <141> 17-12-2012
- <150> 61/729050
- <151> 21-11-2012
- <150> 61/585993
- <151> 12-01-2012
- <150> 61/578780
- <151> 21-12-2011
- <160> 575
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 232
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 751 386 T3

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

<210> 2

<211> 699

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 751 386 T3

```

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      60
ggggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg      120
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag      240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc      360
atctccaaag ccaaaggga gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg      420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc      480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct      540
cccgctgctg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc      600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata      699

```

<210> 3

<211> 228

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 751 386 T3

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

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 4

<211> 687

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 751 386 T3

```

gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca      60
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc      120
acgtgctggtg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg      180
gacggcatgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg      240
ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac      300
aagtgaagg tctccaacaa aggcctccca gcccctcgc agaaaacct ctccaaaacc      360
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc      420
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg      480
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac      540
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag      600
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacacagaag      660
agcctctccc tgtctccggg taaatga      687

```

<210> 5
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

```

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1          5          10          15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
20          25          30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu
35          40          45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro
50          55          60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
65          70          75          80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
85          90          95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp
100         105         110

```

ES 2 751 386 T3

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg
165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
195 200 205

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn
210 215 220

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser
245 250 255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
275

<210> 6

<211> 840

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 6

gagctcaaaa cccacttgg tgacacaact cacacatgcc cacggtgccc agagcccaaa	60
tcttgtgaca cacctcccc gtgccacgg tgcccagagc ccaaattcttg tgacacacct	120
ccccatgcc cacggtgccc agagcccaaa tcttgtgaca cacctcccc gtgccaag	180
tgcccagcac ctgaactcct gggaggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag	240
gataccctta tgatttcccg gaccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccac	300
gaagaccccg aggtccagtt caagtgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag	360

ES 2 751 386 T3

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgttccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 420
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 480
 ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa accaaaggac agccccgaga accacaggtg 540
 tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 600
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcagcgg gcagccggag 660
 aacaactaca acaccacgcc tcccatgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 720
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaaca tcttctcatg ctccgtgatg 780
 catgaggctc tgcacaaccg cttcacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 840

<210> 7

<211> 229

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110

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

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

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

ES 2 751 386 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
180 185 190

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
225

<210> 8

<211> 690

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

gagtcctaaat atggtccccc atgcccatca tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca	60
tcagtcttcc tgttccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gaccctgag	120
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac	180
gtggatggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc	240
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc cgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa	360
gccaaagggc agccccgaga gccacagggtg tacaccctgc ccccatocca ggaggagatg	420
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc	480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccggtgctg	540
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctaaccg tggacaagag caggtggcag	600
gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	660
aagagcctct ccctgtctct gggtaaatga	690

<210> 9

<211> 267

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

ES 2 751 386 T3

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

<210> 10

<211> 99

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 751 386 T3

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30

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

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

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 11

<211> 235

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
20 25 30

Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
35 40 45

Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
50 55 60

Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
65 70 75 80

Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
85 90 95

ES 2 751 386 T3

Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
100 105 110

Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
115 120 125

Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
145 150 155 160

Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Met Asp Ala
165 170 175

Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
180 185 190

His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
195 200 205

Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
210 215 220

Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp
225 230 235

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
1 5 10 15

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

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

	85	90	95
	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
	100	105	110
	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp		
	115	120	
5	<210> 13 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
10	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"		
15	<220> <221> VARIANT <222> (2)..(7) <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"		
20	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(7) <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"		
25	<400> 13 Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys 1 5		
30	<210> 14 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
35	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"		
40	<220> <221> VARIANT <222> (2)..(8) <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"		
45	<220> <221> misc_feature <222> (2)..(8) <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"		
	<400> 14 Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys 1 5		
	<210> 15 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
	<220> <221> source		

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(9)
 5 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(9)
 10 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 15

Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys
 1 5 10

<210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(8)
 25 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(8)
 30 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 16

Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly
 1 5 10

<210> 17
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(9)
 40 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 45 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 17

50

Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
10 <221> VARIANT
<222> (3)..(10)
<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (3)..(10)
<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 18
- - - - -
Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly
20 1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
30 <221> VARIANT
<222> (4)..(9)
<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
35 <221> misc_feature
<222> (4)..(9)
<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 19
Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 20
40 <211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
50 <221> VARIANT
<222> (4)..(10)
<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(10)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 5 dichas posiciones"
 <400> 20
 Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (4)..(11)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(11)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 dichas posiciones"
 25 <400> 21
 Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(10)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(10)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 dichas posiciones"
 <400> 22
 Gly Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly Gly
 45 1 5 10
 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(11)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(11)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 23
 Gly Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(12)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(12)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 24
 Gly Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
 <221> Variation
 <222> (109)..(111)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (112)..(114)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation

<222> (115)..(117)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

5 <220>
 <221> Variation
 <222> (118)..(120)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

10 <220>
 <221> Variation
 <222> (121)..(123)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

15 <220>
 <221> Variation
 <222> (124)..(126)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (109)..(126)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 25

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg	60
gggggaccgt cagtcttccct cttcccccca aaaccaagg acaccctcaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	180
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	240
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	300
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag	360
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca	420
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat	480
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	540
acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttccctc acagcaagct caccgtggac	600
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	660
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga	705

<210> 26
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT

<222> (37)..(42)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (37)..(42)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 26

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

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

Lys Asp Thr Leu Lys Lys Lys Lys Lys Thr Pro Glu Val Thr Cys
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 27
 <211> 711
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

10 <220>
 <221> Variation
 <222> (277)..(279)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

15 <220>
 <221> Variation
 <222> (280)..(282)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20 <220>
 <221> Variation
 <222> (283)..(285)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25 <220>
 <221> Variation
 <222> (286)..(288)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30 <220>
 <221> Variation
 <222> (289)..(291)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

35 <220>
 <221> Variation
 <222> (292)..(294)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (277)..(294)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 27

ES 2 751 386 T3

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcacaaaa aaaaaaaaaa aaaacaccag 300
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct cccagccccc 360
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg 420
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 480
 ttctatccc ggcacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac 540
 aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc 600
 gtggacaaga gcagggtgga gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct 660
 ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaatg a 711

- 5 <210> 28
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- 10 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (93)..(98)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
- 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (93)..(98)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"
- 20 <400> 28

ES 2 751 386 T3

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

<210> 29

<211> 729

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> Variation

<222> (286)..(288)

<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

5 <220>
 <221> Variation
 <222> (289)..(291)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

10 <220>
 <221> Variation
 <222> (292)..(294)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

15 <220>
 <221> Variation
 <222> (295)..(297)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20 <220>
 <221> Variation
 <222> (298)..(300)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25 <220>
 <221> Variation
 <222> (301)..(303)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (286)..(303)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 29

ES 2 751 386 T3

```

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg      120
acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag      240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccggtg gttgtaaaaa aaaaaaaaaa      300
aaatgtggtg gtcaccagga ctggttgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac      360
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag      420
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg      480
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcccg tggagtggga gagcaatggg      540
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc      600
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc      660
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg      720
ggtaaatga                                          729

```

<210> 30

<211> 242

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

10 <221> VARIANT

<222> (96)..(101)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (96)..(101)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 30

ES 2 751 386 T3

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

Gly Lys

<210> 31

<211> 705

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
 <221> Variation
 <222> (646)..(648)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 5 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (649)..(651)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 10 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (652)..(654)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 15 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (655)..(657)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 20 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (658)..(660)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 25 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (646)..(660)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 30 para dichas posiciones"

<220>
 <221> Variation
 <222> (664)..(666)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 35 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (664)..(666)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 40 para dichas posiciones"

<220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

45 <400> 31

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaaggg acaccctcat gatctcccg 120
 cacacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcaag 180
 ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag 240
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccc tcctgcacca ggactggctg 300
 aatggcaagg agtacaagtg caagggtctc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 360
 accatctcca aagccaaagg gcagccccga gagccacagg tgtacaccct gcccccatcc 420
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc 480
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 540
 cctcccggtg tggactccga cggctccttc ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 600
 agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcataaaaa aaaaaaaaaa 660
 cacaatata cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 705

<210> 32

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

10 <221> VARIANT

<222> (215)..(219)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (215)..(219)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<220>

20 <221> VARIANT

<222> (221)..(221)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (221)..(221)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 32

ES 2 751 386 T3

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

<210> 33

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> Variation

<222> (223)..(225)

<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

5

<220>
 <221> Variation
 <222> (226)..(228)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

10

<220>
 <221> Variation
 <222> (229)..(231)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

15

<220>
 <221> Variation
 <222> (232)..(234)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20

<220>
 <221> Variation
 <222> (235)..(237)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25

<220>
 <221> Variation
 <222> (238)..(240)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (223)..(240)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

35

<220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 33

ES 2 751 386 T3

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccacgacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 120
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatggtggtt gtaaaaaaaa aaaaaaaaaa 240
 tgtggtggtg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 300
 agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 360
 tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 420
 cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 480
 agcctgacct gcctgggtcaa aggtcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 540
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 600
 ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 660
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 720
 tctccgggta aatga 735

<210> 34

<211> 244

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

10 <221> VARIANT

<222> (75)..(80)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (75)..(80)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 34

ES 2 751 386 T3

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

Ser Pro Gly Lys

<210> 35

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>
 <221> Variation
 <222> (517)..(519)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 5 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (520)..(522)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 10 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (523)..(525)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 15 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (526)..(528)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 20 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (529)..(531)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 25 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (532)..(534)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 30 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (517)..(534)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 35 para dichas posiciones"

<220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

40 <400> 35

ES 2 751 386 T3

```

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg      60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccg      120
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc      180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag      240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc      360
atctccaaag ccaaagggca gcccggagag ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg      420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc      480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggt ggttgtaaaa aaaaaaaaaa aaaatgtggt      540
ggtgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc      600
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      660
tcattgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg      720
tctccgggta aatga                                          735

```

<210> 36

<211> 244

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

10 <221> VARIANT

<222> (173)..(178)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (173)..(178)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 36

ES 2 751 386 T3

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

Ser Pro Gly Lys

<210> 37

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> Variation

<222> (439)..(441)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

5

<220>
 <221> Variation
 <222> (442)..(444)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

10

<220>
 <221> Variation
 <222> (445)..(447)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

15

<220>
 <221> Variation
 <222> (448)..(450)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20

<220>
 <221> Variation
 <222> (451)..(453)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25

<220>
 <221> Variation
 <222> (454)..(456)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (439)..(456)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

35

<220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 37

ES 2 751 386 T3

```

gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccccagcacc tgaactcctg      60
ggggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg      120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag      240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc      360
atctccaaag ccaaaggcca gcccggagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg      420
gatgagctgg gtggttgtaa aaaaaaaaaa aaaaaatgtg gtggtacca gaaccaggtc      480
agcctgacct gcctggtcaa agcttcttat ccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc      540
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc      600
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      660
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg      720
tctccgggta aatga                                          735

```

<210> 38

<211> 244

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

10 <221> VARIANT

<222> (147)..(152)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (147)..(152)

<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 38

ES 2 751 386 T3

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

Ser Pro Gly Lys

<210> 39

<211> 735

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<220>

<221> modified_base

<222> (439)..(440)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

5
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (442)..(443)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

10
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (445)..(446)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

15
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (448)..(449)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (451)..(452)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

<220>
 <221> modified_base
 <222> (454)..(455)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 39

gagcccaaat	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaactcctg	60
gggggaccgt	cagtcttctt	cttcccccca	aaaccaaggt	acaccctcat	gatctcccgt	120
acccttgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	180
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	240
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcacctgcc	tgcaccagga	ctggctgaat	300
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	360
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagag	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgt	420
gatgagctgg	gtggttgttn	knnknnknnk	nnknnktgtg	gtggtaccaa	gaaccaggtc	480
agcctgacct	gcctgggtcaa	aggcttctat	cccagcgcga	tcgccgtgga	gtgggagagc	540
aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccc	tgctggactc	cgacggctcc	600
ttcttctctt	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	660
tcattgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	720
25	tctccgggta	aatga				735

<210> 40
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (147)..(152)
 <223> Cualquier aminoácido

ES 2 751 386 T3

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly Gly Thr Lys Asn Gln Val
145 150 155 160

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

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
180 185 190

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
195 200 205

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
210 215 220

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
225 230 235 240

Ser Pro Gly Lys

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 41
 Gly Gly Cys His Leu Pro Phe Ala Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 42
 Gly Gly Cys Trp Pro Leu Gln Asp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 43
 Gly Gly Cys Gly His Glu Tyr Met Trp Cys Gly Gly
 20 1 5 10
 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 44
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Met Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 45
 Gly Gly Cys Ala Leu Tyr Pro Thr Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 46
 Gly Gly Cys Met Gln Val Trp Gly Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 47
 Gly Gly Cys Gln Lys Gly Trp Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 48
 Gly Gly Cys Met Val Pro Phe Ser Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 49
 Gly Gly Cys Val Asn Thr Trp Trp Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 50
 Gly Gly Cys Ile Gly Pro Phe Trp Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 51
 Gly Gly Cys Asp Arg Pro Val Trp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 52
 Gly Gly Cys Asn Met Leu Trp Gly Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 53
 Gly Gly Cys Tyr Ile Thr Gln Lys Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 54
 His Leu Pro Phe Ala Val
 1 5
 30 <210> 55
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 55
 Trp Pro Leu Gln Asp Tyr
 1 5
 40 <210> 56
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 56

Gly His Glu Tyr Met Trp
 1 5
 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 57
 Val Phe Asn Met Phe Asn
 10 1 5
 <210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 58
 Ala Leu Tyr Pro Thr Asn
 1 5
 20 <210> 59
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 59
 Met Gln Val Trp Gly Ser
 1 5
 30 <210> 60
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 60
 Gln Lys Gly Trp Val Phe
 1 5
 40 <210> 61
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 61

Met Val Pro Phe Ser Met
 1 5
 <210> 62
 <211> 6
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 62
Val Asn Thr Trp Trp Ser
 10 1 5
 <210> 63
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 63
Ile Gly Pro Phe Trp Trp
 1 5
 20 <210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 64
Asp Arg Pro Val Trp Phe
 1 5
 30 <210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 65
Asn Met Leu Trp Gly Ser
 1 5
 40 <210> 66
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 66

Tyr Ile Thr Gln Lys Leu
1 5
 <210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 67
Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly
 10 **1 5 10**
 <210> 68
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 68
gctgtggagt gggaggggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg tagcaatggg 60
cagccg 66
 20 <210> 69
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 69
cggctgcccc ttgctaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cctcccactc 60
cacagc 66
 30 <210> 70
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 70
gtggagtggg agagcgggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg taatgggcag 60
ccggag 66
 40 <210> 71
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

	<400> 71	
	ctccggctgc ccattaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cgctctccca	60
	ctccac	66
5	<210> 72 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
10	<400> 72	
	tgggagagca atgggggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg tcagccggag	60
	aacaac	66
15	<210> 73 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 73	
	gttgttctcc ggctgaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cccattgct	60
20	ctccca	66
	<210> 74 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 74	
	gagagcaatg ggcagggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg tccggagaac	60
	aactac	66
30	<210> 75 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 75	
	gtagttgttc tccggaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cctgccatt	60
	gctctc	66
40	<210> 76 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 76
 agcaatgggc agccgggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg tgagaacaac 60
 5 tacaag 66
 <210> 77
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 77
 cttgtagtgg ttctcaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cgggtgccc 60
 attgct 66
 15 <210> 78
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 78
 aatgggcagc cggagggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg taacaactac 60
 aagacc 66
 25 <210> 79
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 79
 ggtctttag ttgttaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cctcgggtg 60
 cccatt 66
 35 <210> 80
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 80
 gggcagccgg agaacggtgg ttgtggtatg ccgatcgaat tctgtggtgg taactacaag 60
 accacg 66
 <210> 81

<211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 81
 cgtggtcttg tagttaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cgttctccgg 60
 ctgccc 66

 <210> 82
 10 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 15 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 82
 cagccggaga acaacggtgg ttgtggtatg cccatcgaat tctgtggtgg ttacaagacc 60
 acgcct 66

 <210> 83
 <211> 66
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 25 <400> 83
 aggcgtggtc ttgtaaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cgttggtctc 60
 cggctg 66

 <210> 84
 <211> 66
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 84
 gtggagtggg agagcgggtg ttgtggtatg cccatcgaat tctgtggtgg tccggagaac 60
 aactac 66

 <210> 85
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 85

	gtagttgttc tccggaccac cacagaattc gatcggcata ccacaaccac cgctctccca	60
	ctccac	66
5	<210> 86 <211> 72 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético" <400> 86	
	gtggagtggg agagcggtagg tggttgtggt atgccgatcg aattctgtgg tgggtggccg	60
10	gagaacaact ac	72
	<210> 87 <211> 72 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético" <400> 87	
	gtagttgttc tccggaccac caccacagaa ttcgatcggc ataccacaac caccaccgct	60
	ctcccactcc ac	72
20	<210> 88 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"	
30	<220> <221> VARIANT <222> (4)..(11) <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"	
35	<220> <221> misc_feature <222> (4)..(11) <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones" <400> 88	
	Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly 1 5 10	
40	<210> 89 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético" <220>	

<221> VARIANT
 <222> (4)..(13)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(13)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"
 10 <400> 89
 Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 90
 Gly Gly Cys His Phe Asp Ile Met Asn Cys Gly Gly
 20 1 5 10
 <210> 91
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 91
 Gly Gly Cys Val Ile Asp Phe Phe Gly Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 92
 Gly Gly Cys Asp Ile Met Ile Phe Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 93
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 93

Gly Gly Cys Met Thr Glu Phe Ala Ile Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 94
 Gly Gly Cys Ile Gln Tyr Trp Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 95
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 95
 Gly Gly Cys Pro Phe Ser Trp Ala Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 96
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 96
 Gly Gly Cys Gly Phe Ala Phe Met Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 97
 Gly Gly Cys Pro Val Leu Leu Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 98
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 98

Gly Gly Cys Pro Phe Thr Trp Thr Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 99
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 99
 Gly Gly Cys Tyr Leu Tyr Trp Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 100
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 100
 Gly Gly Cys Val Ile Asn Met Phe Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 101
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 101
 Gly Gly Cys Pro Phe Thr Trp Asn Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 102
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 102
 Gly Gly Cys Pro Phe Gln Ile Gly Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 103
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 103

Gly Gly Cys Leu Asp Ile Ile Trp Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 104
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 104
 Gly Gly Cys Met Phe Val Phe Pro Ala Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 105
 Gly Gly Cys Val Met Glu Gln Leu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 106
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 106
 Gly Gly Cys Phe Lys Glu Tyr Thr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 107
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 107
 Gly Gly Cys Pro Lys Asp Tyr His Ile Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 108

Gly Gly Cys Glu Val Met Val Phe Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 109
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 109
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Thr Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 110
 Gly Gly Cys Asn Leu Pro Gln Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 111
 Gly Gly Cys Met Ile Ala Pro Met Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 112
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 112
 Gly Gly Cys Met Met Leu Tyr Pro Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 113
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 113

Gly Gly Cys Ile Ile Gly Pro Phe Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 114
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 114
 Gly Gly Cys Thr Gly Met Val Phe Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 115
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 115
 Gly Gly Cys Leu Met Tyr Lys Asn Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 116
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 116
 Gly Gly Cys Ala Phe Gly Ile Met Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 117
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 117
 Gly Gly Cys Arg His Arg Lys Lys Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 118
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 118

Gly Gly Cys Phe Met Gly Ile Trp Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 119
 Gly Gly Cys Pro Ser Leu Pro Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 120
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 120
 Gly Gly Cys Pro Ser Val Phe Thr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 121
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 121
 Gly Gly Cys Gln Glu Tyr Trp Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 122
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 122
 Gly Gly Cys Gln Trp Pro Thr Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 123

```

    ---
    Gly Gly Cys Ile Lys Phe Phe Asp Trp Cys Gly Gly
    1             5             10
    <210> 124
    <211> 12
    <212> PRT
5    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <221> source
    <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

    <400> 124

    Gly Gly Cys Glu Met Ser Phe Phe Leu Cys Gly Gly
    1             5             10
10   <210> 125
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

15   <220>
    <221> source
    <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

    <400> 125

    Gly Gly Cys His Ser Glu Val Glu Tyr Cys Gly Gly
    1             5             10
20   <210> 126
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
25   <221> source
    <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

    <400> 126

    Gly Gly Cys Trp Glu His Pro His Tyr Cys Gly Gly
    1             5             10
30   <210> 127
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <221> source
35   <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

    <400> 127

    Gly Gly Cys Glu Thr Tyr Trp Leu Phe Cys Gly Gly
    1             5             10
40   <210> 128
    <211> 12
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <221> source
    <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
45   <400> 128

```

Gly Gly Cys Arg Val Pro Tyr Pro Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 129
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 129
 Gly Gly Cys Gly Trp Pro Phe Val Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 130
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 130
 Gly Gly Cys Met Leu Phe Leu Glu Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 131
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 131
 Gly Gly Cys Phe His Val Lys Arg Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 132
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 132
 Gly Gly Cys Val Trp Glu Gln Glu His Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 133
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 133

Gly Gly Cys Ile Leu His Phe Lys Asp Cys Gly
 1 5 10
 <210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 134
 Gly Gly Cys His Phe Glu Val Phe Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 135
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 135
 Gly Gly Cys Val Phe Glu Val Met Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 136
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 136
 Gly Gly Cys Met Thr Glu Phe Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 137
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 137
 Gly Gly Cys Glu Gly Asn Met Arg Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 138
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 138

Gly Gly Cys Lys Gly His Met Trp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 139
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 139
 Gly Gly Cys Glu Ala Tyr Trp Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 140
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 140
 Gly Gly Cys Val Phe Ser Arg Phe Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 141
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 141
 Gly Gly Cys Met Met Pro Phe Trp Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 142
 Gly Gly Cys Ile Phe Gln Phe Glu Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 143

Gly Gly Cys Lys Arg Gln Met Trp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 144
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 144
 Gly Gly Cys Lys Thr Pro Asn Pro Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 145
 Gly Gly Cys Lys Ala Phe Tyr Pro Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 146
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 146
 Gly Gly Cys Lys Met Tyr Gln Tyr Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 147
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 147
 Gly Gly Cys Tyr Pro Asp Asn Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 148
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 148

Gly Gly Cys Gln Val Lys Ile Phe Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 149
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 149
 Gly Gly Cys Ser Ile Pro Gln Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 150
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 150
 Gly Gly Cys Lys Met Tyr Gln Ala Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 151
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 151
 Gly Gly Cys Gln Tyr Glu Arg Trp His Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 152
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 152
 Gly Gly Cys Arg Phe Gln His Gln Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 153
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 153

Gly Gly Cys Gln Asn Met Phe Trp Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 154
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 154
 Gly Gly Cys Val Met Glu Ile Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 155
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 155
 Gly Gly Cys Ile Leu Asn Phe Asn Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 156
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 156
 Gly Gly Cys Met His Met Asp Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 157
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 157
 Gly Gly Cys Gln Val Met Val Leu Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 158
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 158

Gly Gly Cys Leu Phe Asp Trp Pro Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 159
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 159
 Gly Gly Cys Lys Met Tyr His Gln Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 160
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 160
 Gly Gly Cys Gln Trp Leu Tyr Glu Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 161
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 161
 Gly Gly Cys Phe Thr Asn Phe Trp Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 162
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 162
 Gly Gly Cys Trp Glu Pro Thr His Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 163
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 163

Gly Gly Cys Ala Phe Ala Met Leu Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 164
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 164
 Gly Gly Cys Met Tyr Gln Arg Gln Ala Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 165
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 165
 Gly Gly Cys Pro Phe Leu Trp Ala Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 166
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 166
 Gly Gly Cys Met Phe Asp His Lys Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 167
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 167
 Gly Gly Cys Met Glu Ile Phe Asn Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 168
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 168

Gly Gly Cys Val Met Glu Arg Leu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 169
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 169
 Gly Gly Cys Glu Tyr Tyr Trp Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 170
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 170
 Gly Gly Cys Pro Phe Ser Trp Asp Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 171
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 171
 Gly Gly Cys Ile Glu Tyr Phe Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 172
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 172
 Gly Gly Cys Val Phe Glu Ile Met Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 173
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 173

Gly Gly Cys Glu Ser Pro Gln Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 174
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 174
 Gly Gly Cys His His Asp Phe Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 175
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 175
 Gly Gly Cys Met Phe Pro Phe Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 176
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 176
 Gly Gly Cys Asn Thr Val Leu Gln Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 177
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 177
 Gly Gly Cys Val Phe Asp Ile Met Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 178
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 178

Gly Gly Cys Met Tyr Gln Gln Pro Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 179
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 179
 Gly Gly Cys Lys Lys Leu Tyr His Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 180
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 180
 Gly Gly Cys Pro His Trp Pro Phe Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 181
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 181
 Gly Gly Cys Pro Ile Phe Pro Met Ile Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 182
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 182
 Gly Gly Cys Met Ser Lys Asp Leu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 183
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 183

Gly Gly Cys Met Phe Gln Met Gly Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 184
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 184
 Gly Gly Cys Tyr Glu Trp Pro Ser Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 185
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 185
 Gly Gly Cys Gln Met Leu Tyr Met Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 186
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 186
 Gly Gly Cys Thr Val Gln Val Phe Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 187
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 187
 Gly Gly Cys Ile Thr Phe Pro Met Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 188
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 188

Gly Gly Cys Val Met Tyr Trp Glu Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 189
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 189
 Gly Gly Cys Met Trp Glu Val Leu His Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 190
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 190
 Gly Gly Cys Met Gln Glu Arg Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 191
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 191
 Gly Gly Cys Val Phe Glu Thr Ile Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 192
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 192
 Gly Gly Cys Gln Trp Ala Asn Ser Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 193
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 193

Gly Gly Cys Lys Phe Gly Gln Trp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 194
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 194
 Gly Gly Cys Val Phe Asp Gln Met Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 195
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 195
 Gly Gly Cys Glu Val Met Ile Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 196
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 196
 Gly Gly Cys Glu Ser Pro Met Phe Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 197
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 197
 Gly Gly Cys Ile Thr Met Phe Gln Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 198
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 198

Gly Gly Cys Val Phe Glu Arg Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 199
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 199
 Gly Gly Cys Gly Phe Glu Ile Phe Met Cys Gly
 1 5 10
 10 <210> 200
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 200
 Gly Gly Cys Leu Leu Gln Phe Thr Gly Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 201
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 201
 Gly Gly Cys His Phe Gln Ile Phe Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 202
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 202
 Gly Gly Cys Pro Phe Asp Trp Asp Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 203
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 203

Gly Gly Cys Val Thr Pro Leu Pro Phe Cys Gly
 1 5 10
 <210> 204
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 204
 Gly Gly Cys Tyr Met Tyr Met Asp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 205
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 205
 Gly Gly Cys Met Phe Glu Trp Tyr Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 206
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 206
 Gly Gly Cys Pro Phe Thr Trp Arg Ile Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 207
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 207
 Gly Gly Cys Glu Asn Asp Trp Lys Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 208

Gly Gly Cys Ala Phe Glu Phe Ile Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 209
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 209
 Gly Gly Cys Pro Val Ala Val Phe Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 210
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 210
 Gly Gly Cys His Phe Asp Ile Phe Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 211
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 211
 Gly Gly Cys Pro Pro Glu Asn Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 212
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 212
 Gly Gly Cys Pro Phe Gln Met Gly Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 213
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 213

Gly Gly Cys Ile Ser Gly Phe Phe Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 214
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 214
 Gly Gly Cys Pro Phe His Phe Gln Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 215
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 215
 Gly Gly Cys Met Phe Gln Ile Ile Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 216
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 216
 Gly Gly Cys Gln Tyr Phe Leu Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 217
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 217
 Gly Gly Cys His Phe Ala Val Leu Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 218
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 218

Gly Gly Cys Trp Asn Val Met Gly Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 219
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 219
 Gly Gly Cys Tyr Thr Thr His Glu Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 220
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 220
 Gly Gly Cys Leu Tyr Lys Gln Val Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 221
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 221
 Gly Gly Cys Val Phe Ser Ala Leu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 222
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 222
 Gly Gly Cys Pro Phe Gln Phe Gln Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 223
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 223

Gly Gly Cys Ala Phe Leu Met Met Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 224
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 224
 Gly Gly Cys Glu Val Trp Tyr Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 225
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 225
 Gly Gly Cys Ala Phe Asp Ile Gly Val Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 226
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 226
 Gly Gly Cys Leu Ser Pro Leu Met Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 227
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 227
 Gly Gly Cys Pro Phe Ser Trp Val Ile Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 228
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 228

Gly Gly Cys Met Leu Met Phe Gln Gly Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 229
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 229
 Gly Gly Cys Gln Pro Asn His Trp Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 230
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 230
 Gly Gly Cys Ile Asp Thr Tyr Val Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 231
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 231
 Gly Gly Cys His Phe His Leu Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 232
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 232
 Gly Gly Cys Gln Met Ile Phe Ser Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 233
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 233

Gly Gly Cys Lys Met Tyr Gln Pro Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 234
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 234
 Gly Gly Cys Met Trp Gly Val Phe Lys Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 235
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 235
 Gly Gly Cys Gly Leu Phe Gly Gln Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 236
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 236
 Gly Gly Cys Gln Phe Asn Phe Pro Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 237
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 237
 Gly Gly Cys Asn Ile Ala Tyr Pro Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 238
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 238

Gly Gly Cys Lys Thr Ile Pro Ile Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 239
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 239
 Gly Gly Cys Gln Met Glu Leu Phe Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 240
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 240
 Gly Gly Cys Leu Gly Ala Phe Tyr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 241
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 241
 Gly Gly Cys Pro Phe Asn Phe Ala Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 242
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 242
 Gly Gly Cys Gln Phe Asp Ile Leu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 243
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 243

Gly Gly Cys Tyr Tyr Thr His Glu Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 244
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 244
 Gly Gly Cys Gln Gln Arg Trp Arg Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 245
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 245
 Gly Gly Cys Leu Trp Val Asp Glu Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 246
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 246
 Gly Gly Cys Gly Met Leu Gly Trp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 247
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 247
 Gly Gly Cys Trp Glu Gln His Tyr Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 248
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 248

Gly Gly Cys Lys Thr Trp Gln Leu Leu Ile Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 249
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 249
 --- ---
 Gly Gly Cys Glu Gln Asn Trp Thr Leu Tyr Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 250
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 250
 Ser Gly Cys Trp Pro Ser Pro Tyr Ile Phe Pro Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 251
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 251
 Gly Gly Cys Trp Glu Ala Leu Gln Val Asn Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 252
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 252
 Cys Gly Cys Gln Ala Met Val Val Glu Asp Leu Cys Gly
 1 5 10
 40 <210> 253
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 253

Gly Gly Cys Pro Leu Glu Trp Pro Arg Ile Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 254
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 254
 Gly Gly Cys Glu Pro Trp Ile Met Glu Ala Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 255
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 255
 Gly Gly Cys Pro Trp Asp Gln His Ile Asn Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 256
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 256
 Gly Gly Cys Pro Trp Tyr Ile Gln Met Asp His Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 257
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 257
 Ser Gly Cys Gln Pro Trp Glu Ile Ser Tyr Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 258
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 258

Gly Gly Cys Pro Val Met Phe Leu Asp Pro Arg Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 259
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 259
 Gly Gly Cys Ser Ser Asp Val Leu Met Ile Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 260
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 260
 Gly Gly Cys Val Asp Glu Met Val Ile Tyr His Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 261
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 261
 Gly Gly Cys Pro Phe Met Val Asn Leu Tyr Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 262
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 262
 Gly Gly Cys Glu Ser Asp Thr Met Trp Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 263
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 263

Gly Gly Cys Arg Ser Asp Glu Ile Ile Phe Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 264
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 264
 Gly Gly Cys Pro Trp Asp Leu Leu Leu Pro Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 265
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 265
 Gly Gly Cys Pro Trp Ala Met Glu Leu Val His Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 266
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 266
 Ser Gly Cys Thr Ala Ser Met Tyr Trp Glu Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 267
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 267
 Gly Gly Cys Gly Leu Tyr Met Asp Pro Pro Tyr Tyr Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 268
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 268

Gly Gly Cys Pro Val Met Val Met Glu Pro Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 269
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 269
 Gly Gly Cys Gln Thr Glu Phe Ile Leu Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 270
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 270
 Ser Gly Cys Ala Phe Gln Ala His Gly Ala Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 271
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 271
 Gly Gly Cys Pro Asp Phe Met Phe Arg Met Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 272
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 272
 Ser Gly Cys Ser Val Trp Phe Asp Thr Ile Ser Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 273
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 273

Gly Gly Cys Pro Trp Ser Met Glu Ile Ser Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 274
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 274
 Gly Gly Cys Pro Thr Trp Asn Trp Glu Ile Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 275
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 275
 Ser Gly Cys Pro Trp Asp Met His Ile Val Asp Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 276
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 276
 Ser Gly Cys Phe Pro Trp Glu Pro Ala Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 277
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 277
 Gly Gly Cys Pro Phe Gly Trp Asn Val Phe His Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 278
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 278

Gly Gly Cys Pro Trp His Met Glu Val Asn Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 279
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 279
 Gly Gly Cys Pro Phe Ala Leu Gly Met Gly Glu Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 280
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 280
 Gly Gly Cys Met Phe Pro Phe Met Leu Ser Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 281
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 281
 Gly Gly Cys Ala Phe Gln Phe Met Pro Ala His Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 282
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 282
 Gly Gly Cys Gln Ile Gln Gly Phe Glu Phe Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 283
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 283

Gly Gly Cys Pro Met Gly Ile Ile Leu Asp Leu Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 284
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 284
 Gly Gly Cys Leu Met Leu Glu Pro Thr Val Thr Cys Gly Gly
 10 1 5 10
 <210> 285
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 285
 Gly Gly Cys Gly Lys Asn Glu Val Ala Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 286
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 286
 Gly Gly Cys Ser Phe Leu Leu Glu Ile Ala Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 287
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 287
 Gly Gly Cys Asp Val Glu Lys Ile Met Ile Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 288
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 288

Gly Gly Cys Phe Pro Met Thr Pro Trp Gly Leu Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 289
<211> 15
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 289

Ser Gly Cys Asp Trp Tyr Leu Glu Trp Ser Gly Asn Cys Gly Gly
1 5 10 15

10 <210> 290
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 290

Gly Gly Cys Gly Val Glu Ile Met Phe His Gly Cys Gly Gly
1 5 10

20 <210> 291
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 291

Gly Gly Cys Met Asp Gly Leu His Leu Tyr Phe Cys Gly Gly
1 5 10

30 <210> 292
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 292

Ser Gly Cys Pro Ile Phe Ile Phe Asp Tyr Tyr Cys Gly Gly
1 5 10

40 <210> 293
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
<400> 293

Gly Gly Cys Ala Val Trp Ile Phe Ser Asp Ala Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 294
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 294
 Gly Gly Cys Pro Trp Ser Leu His Ile Gln Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 295
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 295
 Ser Gly Cys Ala Phe Ser Met Leu Phe Ile Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 296
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 296
 Ser Gly Cys Leu Pro Trp Glu Leu Tyr Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 297
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 297
 Ser Gly Cys Pro Phe Thr Ile Asn Phe Tyr Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 298
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 298

Gly Gly Cys Pro Ile Trp Phe Thr Trp Ser Thr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 299
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 299
 Gly Gly Cys Gln Ile Gln Val Val Asn Pro Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 300
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 300
 Gly Gly Cys Ala Phe Gln Ile Glu Phe Leu Met Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 301
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 301
 Gly Gly Cys Ala Trp Glu Ile Arg Ile Leu Gly Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 302
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 302
 Gly Gly Cys Pro Tyr Gln Leu Val Ile Met Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 303
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 303

Gly Gly Cys Met Phe Ala Met His Val Phe Gly Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 304
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 304
 Ser Gly Cys Thr Val Met Tyr Thr Leu Gln Ile Phe Gly Gly
 10 1 5 10
 <210> 305
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 305
 Ser Gly Cys Ala His Gln Val Tyr Trp Ala Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 306
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 306
 Gly Gly Cys Pro Asn Phe Phe Asn Phe Trp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 307
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 307
 Gly Gly Cys Ala Phe Glu Phe Ser Ser Ala Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 308
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 308

Ser Gly Cys Gln Thr Met Leu Thr Ala Glu Gly Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 309
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 309
 Gly Gly Cys Val Met Asp Leu Trp Pro Asp Leu Glu Ile Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 310
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 310
 Gly Gly Cys Gln Pro Leu Phe Asp Asp His Asp Thr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 311
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 311
 Gly Gly Cys Pro Phe Glu Leu Val Met Ser Asp Glu Gln Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 312
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 312
 Ser Gly Cys Gly His Gly Met Gln Met Asp Ser Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 313
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 313

Ser Gly Cys Asp Glu Thr Gln Ser Ala Ile Trp Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 314
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 314
 Gly Gly Cys Arg Glu Pro Glu Gln Tyr Trp Thr Val Trp Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 315
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 315
 Ser Gly Cys Gln Glu Lys Lys Asp Leu Tyr Trp Glu Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 316
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 316
 Ser Gly Cys Gly Gln Asp Asn Asp Leu Pro Trp Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 317
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 317
 Gly Gly Cys Val Phe Gln Leu Ser Phe Ser Arg Ser Asp Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 318
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 318

Ser Gly Cys Ala Phe Asp Met Ile Trp Phe Glu Gly Val Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 319
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 319
 Ser Gly Cys Ala Phe Tyr Trp Gln Pro Trp Glu His Ser Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 320
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 320
 Gly Gly Cys Gln Leu Ser Ile Ile Leu Thr Gly Leu Pro Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 321
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 321
 Gly Gly Cys Gly Met Leu Glu Trp Ser Gly Leu Gln Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 322
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 322
 Ser Gly Cys His Glu Lys Ala Leu Thr Tyr Trp Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 323
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 323

Gly Gly Cys Phe Glu Asn Met Gln Val Trp Tyr Asn Glu Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 324
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 324
 Gly Gly Cys Pro Glu Trp Glu Asn Gln Ile Leu Leu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 325
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 325
 Ser Gly Cys Glu Ser Trp Gln Arg Asp Met Asn Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 326
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 326
 Ser Gly Cys Asn Asp Gln Phe Pro Met Tyr Tyr Leu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 327
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 327
 Gly Gly Cys Phe Glu Asp Met Ala Leu Gln Pro Thr Gln Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 328
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 328

Ser Gly Cys Lys Gly Pro Trp Gln Phe Glu Phe Leu Val Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 329
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 329
 Gly Gly Cys Glu Ala Phe Ser Met Lys Phe Asn Asp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 330
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 330
 Gly Gly Cys Val Gln Pro Ala Ile Ala Met Trp Pro Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 331
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 331
 Gly Gly Cys Thr Asp Gln Gly Arg Phe Val Leu Tyr Glu Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 332
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 332
 Gly Gly Cys Pro Val Gln Glu Phe Leu Trp Gly Val Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 333
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 333

Gly Gly Cys Ser Asn Ser Trp Glu Trp Thr Leu Tyr Ala Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 334
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 334
 Ser Gly Cys His Gly Leu Val Glu Trp Gly Tyr Met Ala Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 335
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 335
 Ser Gly Cys Glu Ala Phe Gly Leu Ile Phe Glu Asp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 336
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 336
 Gly Gly Cys Ala Asn Pro Glu Phe Gln Met Trp Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 30 <210> 337
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 337
 Ser Gly Cys Gly Tyr Glu Val Pro Ile Pro Leu Phe Thr Cys Gly Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 338
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 338

Gly Gly Cys Trp Phe Gln Gln Phe Ala Trp Arg Ala Thr Cys Gly Gly
1 5 10 15

<210> 339
<211> 16
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 339

Gly Gly Cys Gly Phe Glu Leu Asn Met Ile Ser Gln Tyr Cys Gly Gly
10 1 5 10 15

<210> 340
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 340

Gly Gly Cys Glu Pro Phe Glu Leu Arg Phe Tyr His Glu Gly Cys Gly
1 5 10 15

Gly

20 <210> 341
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 341

Gly Gly Cys Pro Phe Gln Leu Val Trp Ser Pro Ala Phe Cys Gly Gly
1 5 10 15

30 <210> 342
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 342

Ser Gly Cys Ala Trp Glu Ile Lys Gly Ile Trp Cys Gly Gly
1 5 10

40 <210> 343
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 343

Ser Gly Cys Ser Ser Ile Gln Ser Trp Arg Leu Trp Leu Cys Gly Gly
1 5 10 15

<210> 344
5 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 344

Gly Gly Cys Gly Val Met Gln Val Leu Asn Arg Ala His Cys Gly Gly
1 5 10 15

<210> 345
15 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 345

Arg Gly Cys Gln Val Lys Tyr Tyr Met Gly Glu Gly Asp Cys Gly Gly
1 5 10 15

<210> 346
25 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 346

Gly Gly Cys Pro Val Trp Ile Pro Phe His Trp Glu Glu Cys Gly Gly
30 1 5 10 15

<210> 347
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 347

Ser Gly Cys Leu Leu Trp Gln Gln Ser Met Leu Leu Phe Cys Gly Gly
1 5 10 15

<210> 348
40 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 348

Ser Gly Cys Glu Gln Gln Trp Ser Trp Arg Leu Tyr Leu Cys Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 349
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 349

Gly Gly Cys Ser Val Gln Ser Thr Trp Gln Leu Trp Ala Cys Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 350
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 350

Ser Gly Cys Lys Tyr Pro Ile Phe Trp Asp Thr Ile Asp Cys Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 351
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 351

Ser Gly Cys Val Glu Tyr Gln Tyr Gln Met Val Tyr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 352
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 352

Gly Gly Cys Thr Asp Gln Arg Trp Phe Val Leu Tyr Glu Cys Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 353
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 353

Gly Gly Cys Pro Phe Trp Gln Glu Trp His Leu Ser Tyr Cys Gly Gly
1 5 10 15

5 <210> 354
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 354

Ser Gly Cys Tyr Met Gly Tyr Met His Leu Ile Ala Glu Cys Gly Gly
1 5 10 15

15 <210> 355
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
20 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 355

Gly Gly Cys Phe Met Gly Ser Phe Ser Leu Val Tyr Gly Cys Gly Gly
1 5 10 15

25 <210> 356
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 356

Ser Gly Cys Pro Trp Gly Phe Met Phe Pro Ile Ser Tyr Cys Gly Gly
30 1 5 10 15

<210> 357
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 357

ggaaaagtgc actagaccac catgga 26

40 <210> 358
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 358
ctttgcggcc gctcattatt t 21

5 <210> 359
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

10 <400> 359

Gly Gly Cys Gly Lys His Trp His Gln Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 360
<211> 12
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 360

Gly Gly Cys His Ser Phe Lys His Phe Cys Gly Gly
20 1 5 10

<210> 361
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 361

Gly Gly Cys Glu Arg Phe His His Ala Cys Gly Gly
1 5 10

30 <210> 362
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 362

Gly Gly Cys Ala Gln Gln Trp His His Glu Tyr Cys Gly Gly
1 5 10

40 <210> 363
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
45 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 363

Gly Gly Cys Asp Gly Arg Thr Lys Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 364
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 364
 Gly Gly Cys Met Gln Met Asn Lys Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 365
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 365
 Gly Gly Cys Trp Gly Ser Arg Ser Gln Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 366
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 366
 Gly Gly Cys Gln Gly Met Trp Thr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 367
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 367
 Gly Gly Cys Phe Pro Leu Gln Asp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 368
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 368

Gly Gly Cys Tyr Pro Leu Gln Asp Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 369
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 369
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Ala Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 370
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 370
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Gly Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 371
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 371
 Gly Gly Cys Val Phe Asn His Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 372
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 372
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Ile Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 373
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 373

Gly Gly Cys Val Phe Asn Leu Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 <210> 374
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 374
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Asn Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 10 <210> 375
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 375
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Gln Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 20 <210> 376
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 376
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Ser Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 30 <210> 377
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 377
 Gly Gly Cys Val Phe Asn Thr Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10
 40 <210> 378
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 45 <400> 378

	Gly	Gly	Cys	Val	Phe	Asn	Val	Phe	Asn	Cys	Gly	Gly
	1					5				10		
5	<210> 379 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético" <400> 379											
10	Gly	Gly	Cys	Trp	Gly	Ser	Arg	Ser	Gln	Cys	Gly	Gly
	1				5					10		
15	<210> 380 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético" <400> 380											
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtccggtt ctgctgttca actgtggtgg tgggcagccg											60
	gagaac											66
20	<210> 381 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético" <400> 381											
	gttctccggc tgcccaccac cacagttgaa cagcagaacc ggacaaccac cattgctctc											60
	ccactc											66
30	<210> 382 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético" <400> 382											
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtgttttc tctgctctgt ggtgtggtgg tgggcagccg											60
	gagaac											66
40	<210> 383 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"											

	<400> 383	
	gttctccggc tgcccaccac cacaccacag agcagagaaa acacaaccac cattgctctc	60
	ccactc	66
5	<210> 384 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
10	<400> 384	
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtgaaact tactggttgt tctgtggtgg tgggcagccg	60
	gagaac	66
15	<210> 385 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 385	
	gttctccggc tgcccaccac cacagaacaa ccagtaagtt tcacaaccac cattgctctc	60
20	ccactc	66
	<210> 386 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 386	
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtccgcat tggccgttcg aatgtggtgg tgggcagccg	60
	gagaac	66
30	<210> 387 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
35	<400> 387	
	gttctccggc tgcccaccac cacattcgaa cggccaatgc ggacaaccac cattgctctc	60
	ccactc	66
40	<210> 388 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 751 386 T3

```

<220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 388
gagtgaggaga gcaatgggtg ttgtgctttc gaattcatct actgtgggtg tgggcagccg      60
5  gagaac                                             66
<210> 389
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 389
gttctccggc tgcccaccac cacagtagat gaattcgaaa gcacaaccac cattgctctc      60
ccactc                                             66

15 <210> 390
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 390
gagtgaggaga gcaatgggtg ttgtcagtag ttcttgccgt gtggtgggtg gcagccggag      60
aac                                             63

25 <210> 391
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 391
gttctccggc tgcccaccac cacacggcaa gaagtactga caaccaccat tgctctccca      60
ctc                                             63

35 <210> 392
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 392
Gly Gly Cys Pro His Met Phe Pro Trp Cys Gly Gly
1          5          10
<210> 393
<211> 12

```

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 393

 Gly Gly Cys Gly His Gly Trp Ile Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 394
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 394

 Gly Gly Cys Val Phe Asn Met Phe Asn Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 395
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 395

 Gly Gly Cys Ile Leu Asn Phe Tyr Gly Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 396
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 396

 Gly Gly Cys Arg Glu Pro His Pro Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 397
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 397

 Gly Gly Cys Pro Phe Glu Phe Thr Gln Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 398
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 398

 Gly Gly Cys Gln Leu Gly Ser Met His Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 399
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 399

 Gly Gly Cys Tyr Glu Asn Lys Thr Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 400
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 400

 Gly Gly Cys Arg Ala Gly Tyr Gly Asp Ala Ser Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 401
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 401

 Gly Gly Cys Met Val Pro Phe Ser Met Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 402
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 402

 Gly Gly Cys Glu Leu Gln Glu Arg Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 403
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 403

 Gly Gly Cys Pro Ala Asn Trp Gly Thr Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 404
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 404

 Gly Gly Cys Met Met Glu Phe Ala Gln Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 405
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 405

 Gly Gly Cys Gln His His Ile Met Gln Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 406
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 406

 Gly Gly Cys Tyr Gln His His Met Glu Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 407
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 407

 Gly Gly Cys Met Val Pro Phe Ser Met Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 408
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 408

 Gly Gly Cys Gln Lys Gly Trp Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 409
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 409

 Gly Gly Cys Val Tyr Asp Val Lys Lys Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 410
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 410

 Gly Gly Cys Leu Lys Gly Met His Gly Ser Ala Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 411
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 411

 Gly Gly Cys Asn Met Leu Trp Gly Ser Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 412
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 412

 Gly Gly Cys Met Gln Pro Trp Ala Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 413
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 413

 Gly Gly Cys Met Thr Gln Tyr Asn Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 414
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 414

 Gly Gly Cys Val Asn Thr Trp Trp Ser Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 415
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 415

 Gly Gly Cys Tyr Ile Thr Gln Lys Leu Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 416
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 416

 Gly Gly Cys Glu Thr His Tyr Thr Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 417
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 417

 Gly Gly Cys Thr Glu Gln Val Met Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 418
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 418

 Gly Gly Cys Ile Thr Glu Phe Ser His Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 419
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 419

 Gly Gly Cys Gln Asn Arg Ser Tyr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 420
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 420

 Gly Gly Cys His Gly Thr Lys Gln Phe Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 421
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 421

 Gly Gly Cys Asn Pro His Arg Thr Pro Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 422
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 422

 Gly Gly Cys Gln His Ser Pro Pro Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 423
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 423

 Gly Gly Cys Asn His Glu Glu Thr Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 424
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 424

 Gly Gly Cys Gln Tyr Pro Arg Lys Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 425
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 425

 Gly Gly Cys Ile Gly Pro Phe Trp Trp Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 426
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 426

 Gly Gly Cys Met Gln Pro Trp Ile Asn Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 427
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 427

 Gly Gly Cys Val Gln His Lys Met Gly Val Val Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 428
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 428

 Gly Gly Cys Glu Met Glu Asn Ala Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 429
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 429

 Gly Gly Cys Pro Pro Trp Pro Glu Arg Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 430
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 430

 Gly Gly Cys His Asp Pro Glu Pro Phe Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 431
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 431

 Gly Gly Cys Asn Glu Pro Lys Tyr Val Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 432
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 432

 Gly Gly Cys Asp Arg Pro Val Trp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 433
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 433

 Gly Gly Cys Glu Ile Pro His Ser Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 434
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 434

 Gly Gly Cys Met Pro Tyr Glu Met His Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 435
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 435

 Gly Gly Cys Lys Arg Glu Asn Pro Tyr Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 436
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 436

 Gly Gly Cys Ala Glu Arg Gln Tyr Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 437
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 437

 Gly Gly Cys Asn Val Leu Asp Leu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 438
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 438

 Gly Gly Cys Lys Ser Met Ile Ser Met Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 439
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 439

 Gly Gly Cys His His Lys Gln Asp Gln Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 440
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 440

 Gly Gly Cys Asn Ala Thr Leu Ser Gly Tyr Leu Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 441
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 441

 Gly Gly Cys Glu Ala Thr Met Thr Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 442
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 442

 Gly Gly Cys Asn Val Leu Asp Leu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 443
 45 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 443

 Gly Gly Cys Ser Arg Val Phe Lys Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 444
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 444

 Gly Gly Cys His Ala Pro Gln Trp Glu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 445
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 445

 Gly Gly Cys Pro Leu Val Arg Ala Asp Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 446
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 446

 Gly Gly Cys Met His Asn Glu Glu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 447
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 447

 Gly Gly Cys Met Phe Glu Thr Lys Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 448
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 448

 Gly Gly Cys Asn Met Asn Glu Trp Lys Ser Gly Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 449
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 449

 Gly Gly Cys Leu Gln Asn Leu Tyr Val Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 450
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 450

 Gly Gly Cys Gln Thr Ser Met Lys Asn Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 451
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 451

 Gly Gly Cys Asn Leu Gly His Met Pro Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 452
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 452

 Gly Gly Cys Trp Met Trp Ala Glu Glu Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 453
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 453

 Gly Gly Cys Val His Asn Asp Lys Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 454
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 454

 Gly Gly Cys Tyr Gly Lys Ala Gly Met Arg Asp Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 455
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 455

 Gly Gly Cys Val Ser Ala Ala Thr Ser Arg Thr Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 456
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 456

 Gly Gly Cys Tyr Pro Gln Lys Glu Ile Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 457
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 457

 Gly Gly Cys Asn Gln Ser Ser Ser Arg Glu Ala Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 458
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 458

 Gly Gly Cys Asn Pro Val Ser Thr Gly Ala Tyr Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 459
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 459

 Gly Gly Cys Pro Gly His Glu Phe Arg Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 460
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 460

 Gly Gly Cys Gly Glu Tyr Asn Tyr Val Gly Gly Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 461
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 461

 Gly Gly Cys Lys Trp Ser Met Thr Lys Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 462
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 40 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 462

 Gly Gly Cys Asp Trp His Arg Met Lys Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 463
 45 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 463

 Gly Gly Cys Met His Ser Pro His Ala Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 464
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 464

 Gly Gly Cys Met Met Trp Lys Val Asn Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 465
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 465

 Gly Gly Cys Phe Thr Asn Tyr Ala Ser Glu Lys Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 466
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 466

 Gly Gly Cys Asp Arg Phe Gln Asn Val Asn Val Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 467
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 467

 Gly Gly Cys Glu Arg His Phe Pro Ala Leu Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 468
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 468

 Gly Gly Cys Thr Leu Gly Ser Ala Pro Thr Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 469
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 469

 Gly Gly Cys Glu Met Met Lys Asn Lys Ser Gly Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 470
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 470

 Gly Gly Cys Glu Ala Ser Gly Gln Ile Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 471
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 471

 Gly Gly Cys Leu Arg Asn Phe Met Lys Gln Ser Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 472
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 472

 Gly Gly Cys Pro Asn Asp Thr Val Arg Asp Ala Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 473
 <211> 14

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 473

 Gly Gly Cys Ser Phe Ser Arg His Met Gly Ala Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 474
 <211> 14
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 474

 Gly Gly Cys Ala Lys Asp Gln His Thr Gly Ser Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 475
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 475

 Gly Gly Cys Leu Gly Leu Arg Gln Glu Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 476
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 476

 Gly Gly Cys Asn Met Asn Glu Trp Lys Ser Gly Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 477
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 477

 Gly Gly Cys Gln Gln Ile Lys Glu Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 478
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 478

 Gly Gly Cys Asp Leu Pro Asn Glu Met Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 479
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 479

 Gly Gly Cys Met Phe Ser His Pro His Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 480
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 480

 Gly Gly Cys Ala Gly Pro Tyr Trp Ala Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 481
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 481

 Gly Gly Cys Glu Gln Gln Phe Val Thr Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 482
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 482

 Gly Gly Cys Met Gly Trp Trp His Leu Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 483
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 483

 Gly Gly Cys Pro Gln His Gly Glu Met Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 484
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 484

 Gly Gly Cys Tyr Ala Ser Pro His Glu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 485
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 485

 Gly Gly Cys Met Pro Pro Gln Trp Met Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 486
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 486

 Gly Gly Cys Asp Thr Ile Gly Trp Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 487
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 487

 Gly Gly Cys Gly Ile Phe Glu Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 488
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 488

 Gly Gly Cys Gly Pro Tyr Lys Thr Glu Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 489
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 489

 Gly Gly Cys Gln Pro Gln Ala Ser Trp Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 490
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 490

 Gly Gly Cys Asp Arg Gln Val Thr Gly Phe Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 491
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 491

 Gly Gly Ser Gln Arg Ala Pro Ala Ser Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 492
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 492

 Gly Gly Cys Met Met Arg Glu Gln Gly Cys Gly Gly
 1 5 10

 45 <210> 493
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 493

 Gly Gly Cys Leu Leu Pro Asn Met Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 494
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 494

 Gly Gly Cys Cys Pro Val Tyr Gln His Cys Gly Gly
 1 5 10

 <210> 495
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 495

 Gly Gly Cys Leu Met Ser Gln Asp Leu Cys Gly Gly
 25 1 5 10

 <210> 496
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

 <400> 496

 Gly Gly Cys Gly Gly Pro Tyr Val Phe Cys Gly Gly
 1 5 10

 35 <210> 497
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 497

 gagagcaatg gtggtgttt cccgctgcag gactac 36

 45 <210> 498
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 5 <400> 498
 gtagtcctgc agcgggaaac aaccaccatt gctctc 36
 <210> 499
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 499
 15 gagagcaatg gtggttgta cccgctgcag gactac 36
 <210> 500
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 500
 gtagtcctgc agcgggtaac aaccaccatt gctctc 36
 25 <210> 501
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 501
 ggtggtgtg tttcaacgc gtcaactgt ggtggtggg 39
 35 <210> 502
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 40 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 502
 cccaccacca cagttgaacg cgttgaaaac acaaccacc 39
 <210> 503
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 503
 ggtggtgtg tttcaacgg gttcaactgt ggtggtggg 39
 <210> 504
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 10 <400> 504
 cccaccacca cagttgaacc cgttgaaaac acaaccacc 39
 <210> 505
 <211> 39
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 505
 20 ggtggtgtg tttcaacca ttcaactgt ggtggtggg 39
 <210> 506
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 506
 cccaccacca cagttgaaat ggtgaaaac acaaccacc 39
 30 <210> 507
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 507
 ggtggtgtg tttcaacat ctcaactgt ggtggtggg 39
 <210> 508
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 45 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 508
 cccaccacca cagttgaaga tgtgaaaac acaaccacc 39
 <210> 509

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 509

 ggtggtgtgtg tttcaactt gttcaactgt ggtggtggg 39

 10 <210> 510
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 15 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 510

 cccaccacca cagttgaaca agtgaaaac acaaccacc 39

 20 <210> 511
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 25 <400> 511

 ggtggtgtgtg tttcaacaa ctcaactgt ggtggtggg 39

 <210> 512
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 512

 35 cccaccacca cagttgaagt tgtgaaaac acaaccacc 39

 <210> 513
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 513

 ggtggtgtgtg tttcaacca gttcaactgt ggtggtggg 39

 45 <210> 514
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>

<221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 514
 cccaccacca cagttgaact ggtgaaaac acaaccacc 39
 5 <210> 515
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 515
 ggtggtgtg tttcaactc gttcaactgt ggtggtggg 39
 15 <210> 516
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 516
 cccaccacca cagttgaacg agtgaaaac acaaccacc 39
 25 <210> 517
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 517
 ggtggtgtg tttcaacac gttcaactgt ggtggtggg 39
 35 <210> 518
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 518
 40 cccaccacca cagttgaacg tgtgaaaac acaaccacc 39
 <210> 519
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 519

gggtggtgtg tttcaacgt gttcaactgt ggtggtggg 39

<210> 520
<211> 39
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 520

10 cccaccacca cagttgaaca cgttgaaaac acaaccacc 39

<210> 521
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 521

gttcctttct attctcac 18

20 <210> 522
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 522

gaggggtgcc ttgggttttg gggg 24

30 <210> 523
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 523

ggtgaggacg ctgaccacac ggta 24

40 <210> 524
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

45 <400> 524

atgcatcacg gagcatgaga agac 24

<210> 525
<211> 24
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 5 <400> 525
 attatgcacc tccacgccgt ccac 24
 <210> 526
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 526
 15 attgctctcc cactccacgg cgat 24
 <210> 527
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <400> 527
 cccattcaga tctcttc 18
 25 <210> 528
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"
 <220>
 <221> Variation
 <222> (19)..(21)
 35 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"
 <220>
 <221> Variation
 <222> (22)..(24)
 40 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"
 <220>
 <221> Variation
 <222> (25)..(27)
 45 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"
 <220>
 <221> Variation
 <222> (28)..(30)
 50 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (31)..(33)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 5 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (34)..(36)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 10 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(36)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 15 para dichas posiciones"

<220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"
 20

<400> 528
 aaaccaag acacctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaccc ctgaggtcac atgc 54

<210> 529
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

<220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<220>
 <221> Variation
 <222> (19)..(21)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 30 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (22)..(24)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 35 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (25)..(27)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 40 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (28)..(30)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 45 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (31)..(33)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 50 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 55

<222> (34)..(36)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(36)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

10 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 529
 gtgggtcagcg tcttcaccaa aaaaaaaaaa aaaaaaacacc aggactggct gaat 54

15 <210> 530
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

25 <220>
 <221> Variation
 <222> (28)..(30)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30 <220>
 <221> Variation
 <222> (31)..(33)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

35 <220>
 <221> Variation
 <222> (34)..(36)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

40 <220>
 <221> Variation
 <222> (37)..(39)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

45 <220>
 <221> Variation
 <222> (40)..(42)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

50 <220>
 <221> Variation
 <222> (43)..(45)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(45)

<223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> source

5 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 530

gtggtcagcgcg tcctcaccgg tggttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaatgtgg tggtcaccag 60

gactggctga at 72

<210> 531
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source

15 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<220>
<221> Variation
<222> (19)..(21)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20

<220>
<221> Variation
<222> (22)..(24)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25

<220>
<221> Variation
<222> (25)..(27)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30

<220>
<221> Variation
<222> (28)..(30)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

35

<220>
<221> Variation
<222> (31)..(33)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

40

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(33)
<223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

45

<220>
<221> Variation
<222> (37)..(39)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

50

<220>
<221> misc_feature
<222> (37)..(39)

<223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> source

5 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 531

tcatgtctcg tgatgcataa aaaaaaaaaa aaacacaaac actacacgca gaagagc 57

10 <210> 532
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

20 <220>
<221> Variation
<222> (28)..(30)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25 <220>
<221> Variation
<222> (31)..(33)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30 <220>
<221> Variation
<222> (34)..(36)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

35 <220>
<221> Variation
<222> (37)..(39)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

40 <220>
<221> Variation
<222> (40)..(42)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

45 <220>
<221> Variation
<222> (43)..(45)
<223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC" o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(45)
<223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<220>
<221> source
<223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 532
 ggcgtggagg tgcataatgg tggttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaatgtgg tggcgccaag 60
 acaaagccgc gg 72

5 <210> 533
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

15 <220>
 <221> Variation
 <222> (28)..(30)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

20 <220>
 <221> Variation
 <222> (31)..(33)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

25 <220>
 <221> Variation
 <222> (34)..(36)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

30 <220>
 <221> Variation
 <222> (37)..(39)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

35 <220>
 <221> Variation
 <222> (40)..(42)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

40 <220>
 <221> Variation
 <222> (43)..(45)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (28)..(45)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 para dichas posiciones"

50 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"

<400> 533
 gtggagtggg agagcaatgg tggttgtaaa aaaaaaaaaa aaaaatgtgg tgggtgggcag 60
 ccggagaaca ac 72

<210> 534

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 534

 gttcctttct attctcac 18

 10 <210> 535
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 15 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <400> 535

 cccattcaga tcctcttc 18

 20 <210> 536
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 25 <220>
 <221> Variation
 <222> (31)..(33)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 30 <220>
 <221> Variation
 <222> (34)..(36)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 35 <220>
 <221> Variation
 <222> (37)..(39)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 40 <220>
 <221> Variation
 <222> (40)..(42)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 45 <220>
 <221> Variation
 <222> (43)..(45)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 50 <220>
 <221> Variation
 <222> (46)..(48)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

<220>
 <221> Variation
 <222> (49)..(51)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 5 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 <220>
 <221> Variation
 <222> (52)..(54)
 <223> /reemplazar="AAC" o "ACT" o "ATC" o "ATG" o "CAG" o "CAT" o "CCG" o "CGT" o "CTG" o "GAA" o "GAC"
 10 o "GCT" o "GGT" o "GTT" o "TAC" o "TCT" o "TGG" o "TTC"

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)..(54)
 <223> /nota="los nucleótidos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones
 15 para dichas posiciones"

 <220>
 <221> source
 <223> /nota="véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y
 realizaciones preferidas"
 20 <400> 536

 ctgcccccat ctcgagatga gctgggttgt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaatgtggt 60

 ggtaccaacc aggtcagcct gacc 84

 <210> 537
 <211> 84
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> source
 <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (31)..(32)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 30

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (34)..(35)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 35

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (37)..(38)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 40

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (40)..(41)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 45

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (43)..(44)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 50

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (46)..(47)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

 <220>

	<221> modified_base	
	<222> (49)..(50)	
	<223> a, c, t, g, desconocido u otro	
5	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (52)..(53)	
	<223> a, c, t, g, desconocido u otro	
	<400> 537	
	ctgcccccat ctcgagatga gctgggttgt nnknnknnkn nknnknnknn knnktgtggt	60
	ggtaccaacc aggtcagcct gacc	84
10	<210> 538	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 538	
	ggccccgtga tggatgatg g 21	
20	<210> 539	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 539	
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtcatctg ccgttcgctg tttgtggtgg tgggcagccg	60
	gagaac	66
30	<210> 540	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 540	
	gttctccggc tgcccaccac cacaacacgc gaacggcaga tgacaaccac cattgctctc	60
	ccactc	66
40	<210> 541	
	<211> 66	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> source	
	<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 541	

	gagtgggaga gcaatggtgg ttgttggccg ctgcaggact actgtggtgg tgggcagccg	60
	gagaac	66
5	<210> 542 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 542	
10	gttctccggc tgcccaccac cacagtagtc ctgcagcggc caacaaccac cattgctctc	60
	ccactc	66
	<210> 543 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 543	
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtggtcat gaatacatgt ggtgtggtgg gcagccggag	60
20	aac	63
	<210> 544 <211> 63 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 544	
	gttctccggc tgcccaccac accacatgta ttcatgacca caaccaccat tgetctccca	60
	ctc	63
30	<210> 545 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <221> source <223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"	
	<400> 545	
	gagtgggaga gcaatggtgg ttgtgttttc aacatgttca actgtggtgg tgggcagccg	60
	gagaac	66
40	<210> 546 <211> 66 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <221> source	

<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 546

gttctccggc tgcccaccac cacagttgaa catgttgaaa acacaaccac cattgctctc 60

ccactc 66

5 <210> 547
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 547

gagtgggaga gcaatggtgg ttgtgctctg taccgacta actgtggtgg tgggcagccg 60

gagaac 66

15 <210> 548
<211> 66
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> source
<223> /nota= "Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético"

<400> 548

gttctccggc tgcccaccac cacagttagt cgggtacaga gcacaaccac cattgctctc 60

ccactc 66

25 <210> 549
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 549

Leu Met Ile Ser Arg Thr
1 5

30 <210> 550
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(7)
<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(7)
<223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

45 <400> 550

Leu Lys Lys Lys Lys Lys Lys Thr
 1 5
 <210> 551
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 551
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 1 5
 <210> 552
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)..(7)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(7)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 dichas posiciones"
 25 <400> 552
 Thr Lys Lys Lys Lys Lys Lys His Gln Asp Trp Leu
 1 5 10
 <210> 553
 <211> 18
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 35 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(10)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(10)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 dichas posiciones"
 <400> 553
 Thr Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly His Gln Asp
 1 5 10 15
 45 Trp Leu
 <210> 554

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 554
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 1 5
 <210> 555
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)..(7)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(7)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para
 dichas posiciones"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)..(9)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o
 "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> /nota="El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto al de las anotaciones para dicha
 posición"
 <400> 555
 Met His Lys Lys Lys Lys Lys His Lys His Tyr
 1 5 10
 <210> 556
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 556
 Glu Val His Asn Ala
 1 5
 <210> 557
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(13)

<223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(13)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 557

Glu Val His Asn Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly
 1 5 10 15

Ala

<210> 558
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 558

Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 1 5

<210> 559
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (5)..(10)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(10)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 559

Asn Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly Gly Gly Gln Pro
 1 5 10 15

Glu Asn

<210> 560
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 560

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 1 5

<210> 561
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(14)
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 561
 Asp Glu Leu Gly Gly Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Lys Asn Gln
 20

10

<210> 562
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (7)..(14)
 <223> /reemplazar="Phe" o "Asn" o "Arg" o "Ser" o "Thr" o "Met" o "Ile" o "Glu" o "Asp" o "Gly" o "Ala" o "Val" o "Gln" o "His" o "Pro" o "Leu" o "Tyr" o "Trp"

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(14)
 <223> /nota="Los restos dados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para dichas posiciones"

<400> 562
 Asp Glu Leu Gly Gly Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Lys Asn Gln
 20

30

<210> 563
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 563
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 1 5 10

35

<210> 564
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> source
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 564

Trp Glu Ser Asn Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

5 <210> 565
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 565

Trp Glu Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly Ser Asn
1 5 10 15

10 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

<210> 566
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 566

Trp Glu Ser Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly Asn
1 5 10 15

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

20 <210> 567
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 567

Trp Glu Ser Asn Gly Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly
1 5 10 15

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

30 <210> 568
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

35 <400> 568

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys
1 5 10 15

Gly Gly Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

<210> 569
<211> 25
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 569

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe
1 5 10 15

Cys Gly Gly Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

10 <210> 570
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 570

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu
1 5 10 15

Phe Cys Gly Gly Asn Asn Tyr Lys Thr
20 25

20 <210> 571
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 571

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile
1 5 10 15

Glu Phe Cys Gly Gly Asn Tyr Lys Thr
20 25

30 <210> 572
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
35 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 572

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Gly Gly Cys Gly Met Pro
1 5 10 15

Ile Glu Phe Cys Gly Gly Tyr Lys Thr
20 25

<210> 573
<211> 22
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 573

Trp Glu Ser Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly Pro
1 5 10 15

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20

10 <210> 574
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 574

Trp Glu Ser Gly Gly Gly Cys Gly Met Pro Ile Glu Phe Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
20

20 <210> 575
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> source
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 575

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

30

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido Fc variante que comprende un fragmento de Fc variante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana;

en el que el fragmento de Fc variante comprende una inserción de 3 a 20 aminoácidos en comparación con un fragmento de Fc de control, en el que la inserción en el fragmento de Fc variante es una inserción en una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte del fragmento de Fc de control seleccionada de:

- (a) los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1,
- (b) los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que los aminoácidos 384-386 están eliminados, y
- (c) los aminoácidos 382-391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que la inserción es entre los aminoácidos 382 y 383, 383 y 384, 384 y 385, 385 y 386, 386 y 387, 387 y 388, 388 y 389, 389 y 390 o 390 y 391;

en el que el fragmento de Fc de control comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- los aminoácidos 169-175 de la SEQ ID NO: 1 (fragmento de Fc de IgG1),
- los aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2),
- los aminoácidos 216-222 de la SEQ ID NO: 5 (fragmento de Fc de IgG3), y
- los aminoácidos 166-172 de la SEQ ID NO: 7 (fragmento de Fc de IgG4);

en el que el polipéptido Fc de control comprende el fragmento de Fc de control y tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de Fc variante excepto que el polipéptido Fc de control no contiene la inserción de 3 a 20 aminoácidos;

en el que el polipéptido Fc variante se une a un receptor de Fc neonatal humano (hFcRn) con mayor actividad de unión a pH 6,0 que el polipéptido Fc de control;

en el que el polipéptido Fc variante tiene poca o ninguna actividad de unión para la unión a hFcRn a pH 7,4 y la respuesta de unión residual detectada a pH 7,4 es de no más de 0,2 nanómetros más que la detectada usando el polipéptido Fc de control; y

en el que los valores comparativos para la actividad de unión y la respuesta de unión residual se determinan por interferometría de biocapa.

2. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 1, en el que la respuesta de unión residual detectada a pH 7,4 es de no más de 0,1 nanómetros más que la detectada usando el polipéptido Fc de control.

3. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que el fragmento de Fc de control comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- SEQ ID NO: 1 (fragmento de Fc de IgG1),
- SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2),
- SEQ ID NO: 5 (fragmento de Fc de IgG3), y
- SEQ ID NO: 7 (fragmento de Fc de IgG4).

4. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la inserción del fragmento de Fc variante está en una secuencia de aminoácidos correspondiente a la parte del fragmento de Fc de control que es los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1.

5. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la inserción del fragmento de Fc variante está en una secuencia de aminoácidos correspondiente a la parte del fragmento de Fc de control que es los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que los aminoácidos 384-386 están eliminados.

6. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la inserción del fragmento de Fc variante está en una secuencia de aminoácidos correspondiente a una parte del fragmento de Fc de control seleccionada de: los aminoácidos 382-391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que la inserción es entre los aminoácidos 382 y 383, los aminoácidos 383 y 384, los aminoácidos 384 y 385, los aminoácidos 385 y 386, los aminoácidos 386 y 387, los aminoácidos 387 y 388, los aminoácidos 388 y 389, los aminoácidos 389 y 390 o los aminoácidos 390 y 391.

7. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento de Fc de control comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2).

8. El polipéptido de Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la inserción de 3 a 20 aminoácidos es de al menos seis aminoácidos de longitud.

9. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la inserción de 3 a 20 aminoácidos es de 10 a 20 aminoácidos de longitud.
10. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la inserción de 3 a 20 aminoácidos es de 6 a 16 aminoácidos de longitud.
- 5 11. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-10, en el que la inserción es entre los aminoácidos 382 y 383, los aminoácidos 383 y 384, los aminoácidos 384 y 385, los aminoácidos 385 y 386, los aminoácidos 386 y 387 o los aminoácidos 387 y 388 del fragmento de Fc variante usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1.
- 10 12. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 9, en el que la inserción es entre los aminoácidos 384 y 385, usando el sistema de numeración EU; o en el que los aminoácidos 384-386 están eliminados y la inserción es entre los aminoácidos 383 y 387, usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1.
13. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la inserción es de la posición 382 a 386, 387 o 388, usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1.
- 15 14. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 13, en el que el fragmento de Fc de control es un fragmento de Fc de IgG2 humana.
15. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la inserción comprende al menos una cisteína entre los cuatro primeros aminoácidos insertados y al menos una cisteína entre los cuatro últimos aminoácidos insertados.
- 20 16. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 15, en el que los tres primeros aminoácidos de la inserción son Gly-Gly-Cys y los tres últimos aminoácidos de la inserción son Cys-Gly-Gly.
17. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la inserción comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-24, 41-67, 90-356, 359-367, 369, 372, 373, 375-379, los aminoácidos 4-8 de la SEQ ID NO: 216; los aminoácidos 4-9 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-53, 67, 90-163, 165-215, 217-247 y 359-378, los aminoácidos 4-10 de la SEQ ID NO: 164, los aminoácidos 4-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 248-288, 290-306 y 342, los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO: 289 o 307 y los aminoácidos 4-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 308-341 y 343-356.
- 25 18. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 17, en el que la inserción tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-45, 54-58, 97, 127, 180, 208, 216 y 221.
- 30 19. El polipéptido Fc variante de la reivindicación 17, en el que la inserción es entre los aminoácidos 384 y 385, usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1.
20. El polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19,
que es una proteína de fusión de Fc variante que comprende un polipéptido que no es de anticuerpo,
que es un anticuerpo que comprende una región VH, una región VL, una región CH2 y una región CH3,
que es monovalente o divalente, y/o
35 que es un dímero o un tetrámero.
21. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido Fc variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.
22. Una célula hospedadora que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 21.
23. Un método para preparar un polipéptido Fc variante que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 22 en condiciones tales que se exprese el ácido nucleico, y recuperar el polipéptido Fc variante
40 expresado del medio de cultivo o la masa celular.
24. Un método para prolongar la semivida de un polipéptido Fc que comprende un fragmento de Fc de IgG humana, en el que el método comprende:
(1) seleccionar un sitio para la inserción de un péptido en una secuencia de aminoácidos del fragmento de Fc de IgG humana, en el que dicho sitio para inserción se selecciona de:
45 (a) entre los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1,
(b) entre los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que los aminoácidos 384-386 están eliminados, y
(c) entre los aminoácidos 382-391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que la
50 inserción es entre los aminoácidos 382 y 383, los aminoácidos 383 y 384, los aminoácidos 384 y 385, los aminoácidos 385 y 386, los aminoácidos 386 y 387, los aminoácidos 387 y 388, los aminoácidos 388 y

389, los aminoácidos 389 y 390 o los aminoácidos 390 y 391, usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1;

en el que el fragmento de Fc de control comprende una secuencia de aminoácidos del fragmento de Fc de IgG humana seleccionada de:

- 5 los aminoácidos 169-175 de la SEQ ID NO: 1 (fragmento de Fc de IgG1),
los aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2),
los aminoácidos 216-222 de la SEQ ID NO: 5 (fragmento de Fc de IgG3), y
los aminoácidos 166-172 de la SEQ ID NO: 7 (fragmento de Fc de IgG4);

y

- 10 (2) insertar un péptido en el sitio seleccionado, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NO: 41-67, 90-356, 359-367, 369, 372, 373 y 375-379,
(b) los aminoácidos 4-8 de la SEQ ID NO: 216,
15 (c) los aminoácidos 4-9 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41-53, 67, 90-163, 165-215, 217-247 y 359-378,
(d) los aminoácidos 4-10 de la SEQ ID NO: 164,
(e) los aminoácidos 4-11 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 248-288, 290-306 y 342,
(f) los aminoácidos 4-12 de la SEQ ID NO: 289 o 307, y
(g) los aminoácidos 4-13 de una cualquiera de las SEQ ID NO: 308-341 y 343-356.

- 20 25. El método de la reivindicación 24, en el que la inserción es entre los aminoácidos 382 y 383, los aminoácidos 383 y 384, los aminoácidos 384 y 385 o los aminoácidos 385 y 386 del fragmento de Fc variante, usando el sistema de numeración EU mostrado en tabla 1.

- 25 26. Un método para identificar un fragmento de Fc variante de IgG humana que confiere una semivida *in vivo* más larga a un polipéptido Fc variante y que comprende el fragmento de Fc variante, en comparación con un polipéptido Fc de control, en el que el polipéptido Fc de control comprende un fragmento de Fc de control que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- los aminoácidos 169-175 de la SEQ ID NO: 1 (fragmento de Fc de IgG1),
los aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2),
los aminoácidos 216-222 de la SEQ ID NO: 5 (fragmento de Fc de IgG3),
30 los aminoácidos 166-172 de la SEQ ID NO: 7 (fragmento de Fc de IgG4);

comprendiendo dicho método:

- (1) crear una colección de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de Fc que contienen una inserción que comprende 4-20 aminoácidos aleatorizados, en el que la inserción está en una secuencia de aminoácidos del polipéptido Fc de control seleccionada de:

- 35 (a) los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1,
(b) los aminoácidos 383-387 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que los aminoácidos 384-386 están eliminados, y
(c) los aminoácidos 382-391 usando el sistema de numeración EU mostrado en la tabla 1, en el que la
40 inserción está entre los aminoácidos 382 y 383, los aminoácidos 383 y 384, los aminoácidos 384 y 385, los aminoácidos 385 y 386, los aminoácidos 386 y 387, los aminoácidos 387 y 388, los aminoácidos 388 y 389, los aminoácidos 389 y 390 o los aminoácidos 390 y 391;

- (2) cribar fragmentos de Fc codificados por la colección para identificar los fragmentos de Fc variantes que (i) se unen a hFcRn con mayor actividad de unión a pH 6 que un fragmento de Fc de control y (ii) tienen poca o ninguna actividad de unión para la unión a hFcRn a pH 7,4, que se determina por interferometría de biocapa;

- 45 (3) construir un ácido nucleico que codifica un polipéptido Fc variante que comprende un fragmento de Fc variante identificado en (2), en el que la concentración de un polipéptido Fc de control, que comprende un fragmento de Fc de control en lugar del fragmento de Fc variante, se sabe que disminuye linealmente a lo largo del tiempo cuando se administra a un animal *in vivo*;

- 50 (4) introducir el ácido nucleico de (3) en una célula hospedadora y cultivar la célula hospedadora en condiciones tales que se pueda expresar el polipéptido Fc variante codificado por el ácido nucleico;

- (5) recuperar el polipéptido Fc variante de la masa celular o medio de cultivo celular;

- (6) administrar el polipéptido Fc variante a un primer animal no humano y administrar el polipéptido Fc de control a un segundo animal no humano; y

(7) controlar las concentraciones de los polipéptidos Fc variantes y de control en sangre periférica a lo largo del tiempo después de la administración, identificando de ese modo un fragmento de Fc variante que confiere una semivida *in vivo* más larga y mayor exposición en un polipéptido Fc variante;

5 en el que el polipéptido Fc de control tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido Fc variante excepto que el polipéptido Fc de control no contiene la inserción que comprende 4-20 aminoácidos aleatorizados.

27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en el que el fragmento de Fc de control comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

10 SEQ ID NO: 1 (fragmento de Fc de IgG1),
SEQ ID NO: 3 (fragmento de Fc de IgG2),
SEQ ID NO: 5 (fragmento de Fc de IgG3), y
SEQ ID NO: 7 (fragmento de Fc de IgG4).

28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en el que el fragmento de Fc de control comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 165-171 de la SEQ ID NO: 3.

15 29. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido Fc variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.

30. El polipéptido Fc variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 28, para su uso en el tratamiento de una enfermedad crónica.

20 31. El polipéptido Fc variante para su uso, o la composición farmacéutica para su uso, de acuerdo con la reivindicación 30, en el que el uso es para tratar a un paciente humano, y la enfermedad crónica se selecciona del grupo de enfermedades crónicas que consiste en:

25 (a) una indicación oncológica,
(b) una afección inflamatoria,
(c) una afección relacionada con los huesos,
(d) una afección metabólica,
(e) una afección neurológica, y
(f) dolor crónico.

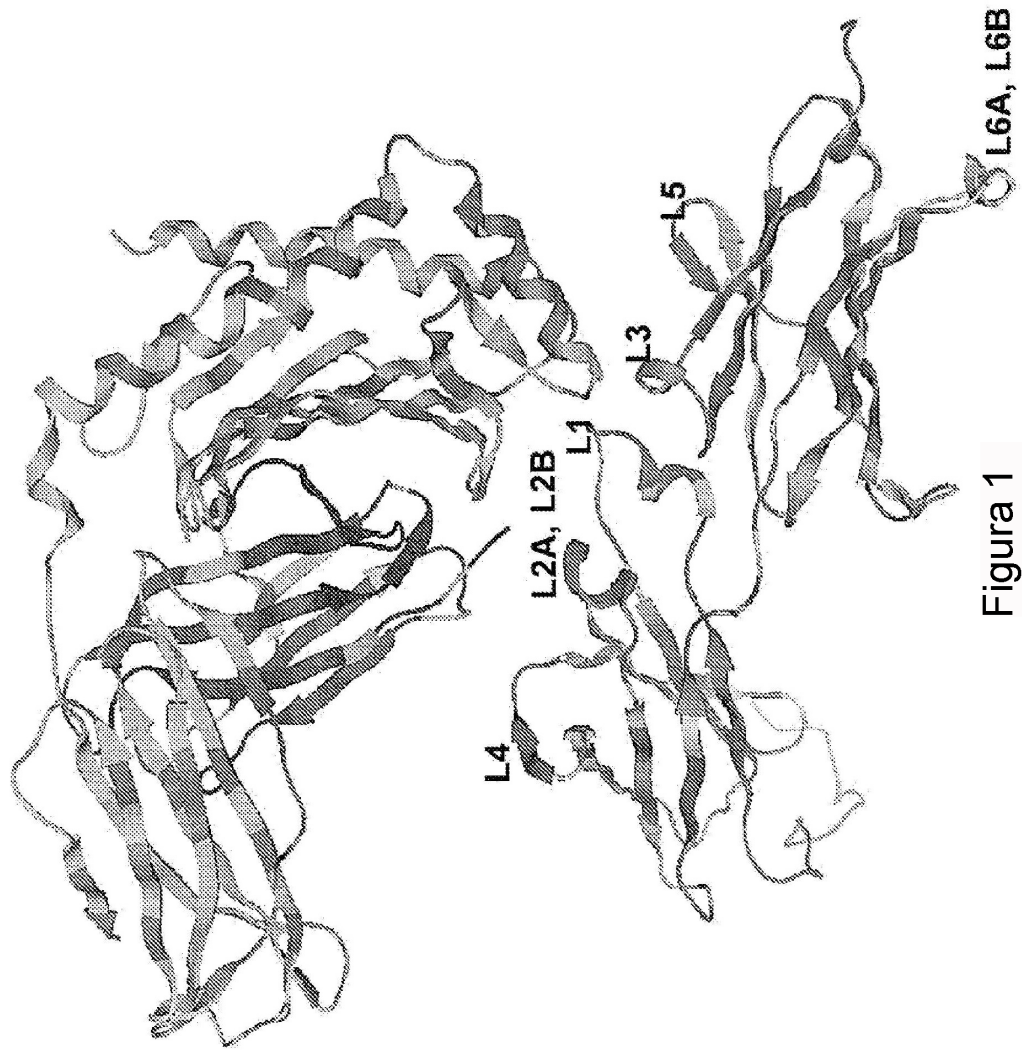


Figura 1

Figura 2

ID de la muestra	Respuesta
5-85	2,0805
5-106	1,7013
5-1	1,6476
5-104	1,5203
5-112	1,5150
5-79	1,5130
5-51	1,5097
5-69	1,4862
5-97	1,4819
5-60	1,4633
5-95	1,4449
5-101	1,4161
5-91	1,3652
5-70	1,3345
5-113	1,3232
5-55	1,3200
5-99	1,3061
5-73	1,2340
5-57	1,2268
5-64	1,2240
5-96	1,2032
5-92	1,1131
5-66	1,0850
5-110	1,0768
FcWT	0,8203

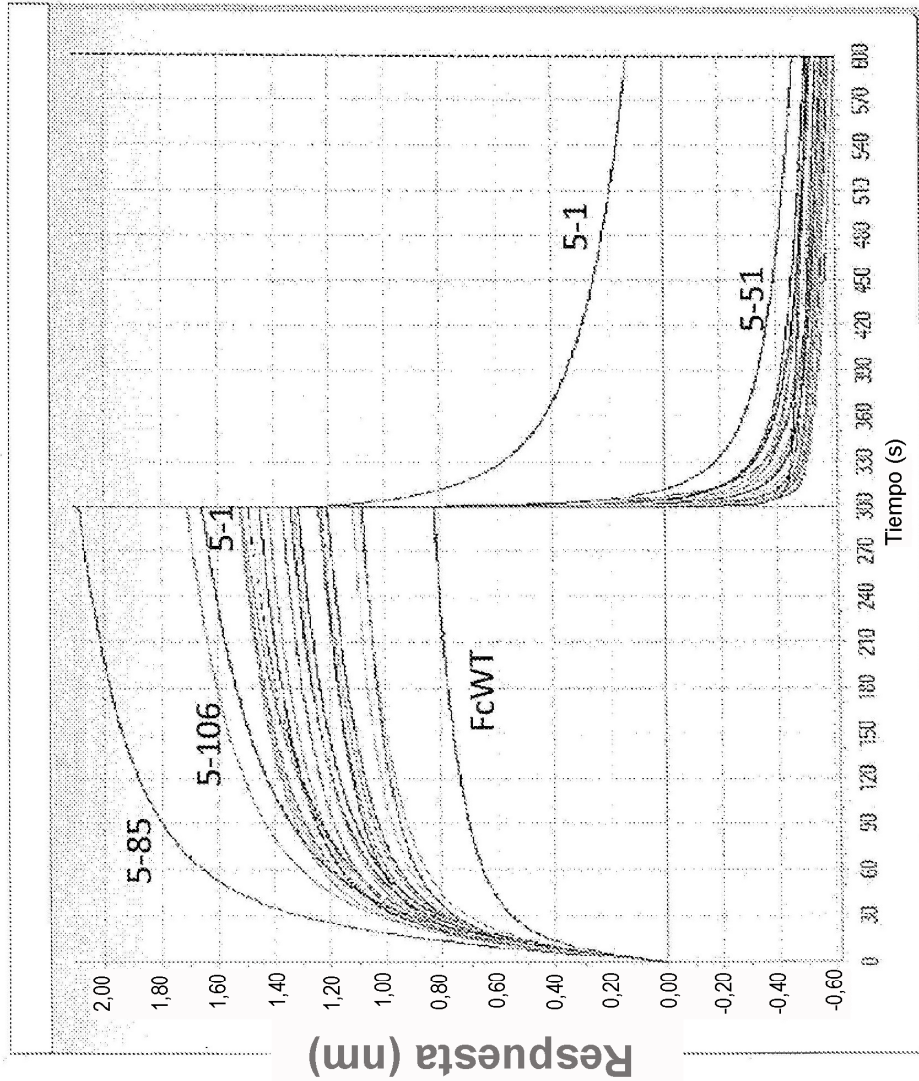


Figura 3

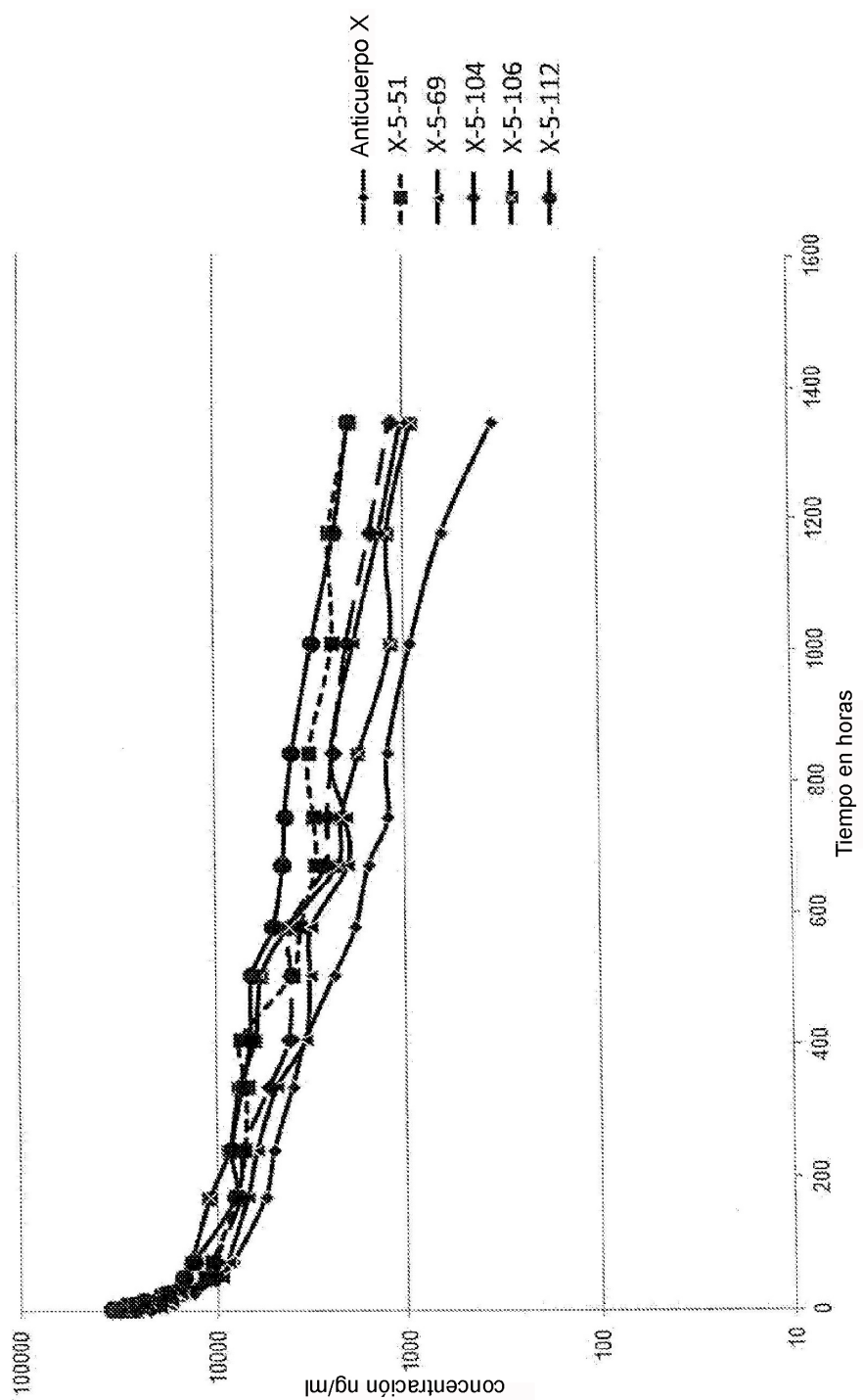


Figura 4

	385 390
Secuencia de tipo silvestre:	WESNGQPENNYKT (SEQ ID NO:563)
Variante 5-1 original:	WESNGGCGMPIEFCCGGQPENNYKT (SEQ ID NO:564)
Variante 5-1-1:	WEGGCGMPIEFCCGSNGQPENNYKT (SEQ ID NO:565)
Variante 5-1-2:	WESGGCGMPIEFCCGGNGQPENNYKT (SEQ ID NO:566)
Variante 5-1-3:	WESNGGCGMPIEFCCGGQPENNYKT (SEQ ID NO:567)
Variante 5-1-4:	WESNGQGGCGMPIEFCCGGPENNYKT (SEQ ID NO:568)
Variante 5-1-5:	WESNGQPGGCGMPIEFCCGGENNYKT (SEQ ID NO:569)
Variante 5-1-6:	WESNGQPEGGCGMPIEFCCGGNNYKT (SEQ ID NO:570)
Variante 5-1-7:	WESNGQPENGGCGMPIEFCCGGNYKT (SEQ ID NO:571)
Variante 5-1-8:	WESNGQPENNGGCGMPIEFCCGGYKT (SEQ ID NO:572)
Variante 5-1-9:	WESGGCGMPIEFCCGGPENNYKT (SEQ ID NO:573)
Variante 5-1-10:	WESGGGCGMPIEFCCGGPENNYKT (SEQ ID NO:574)

Figura 5

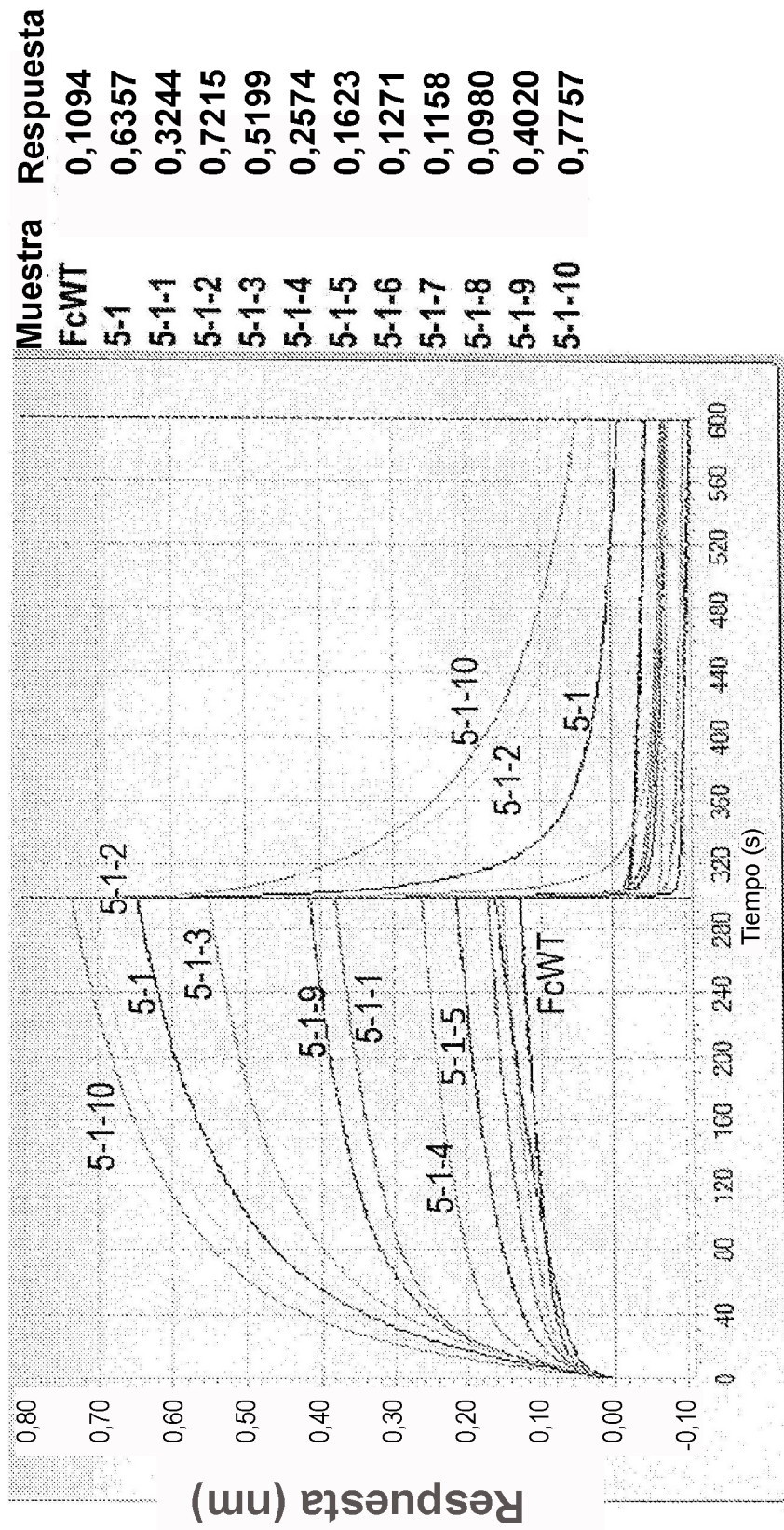


Figura 6

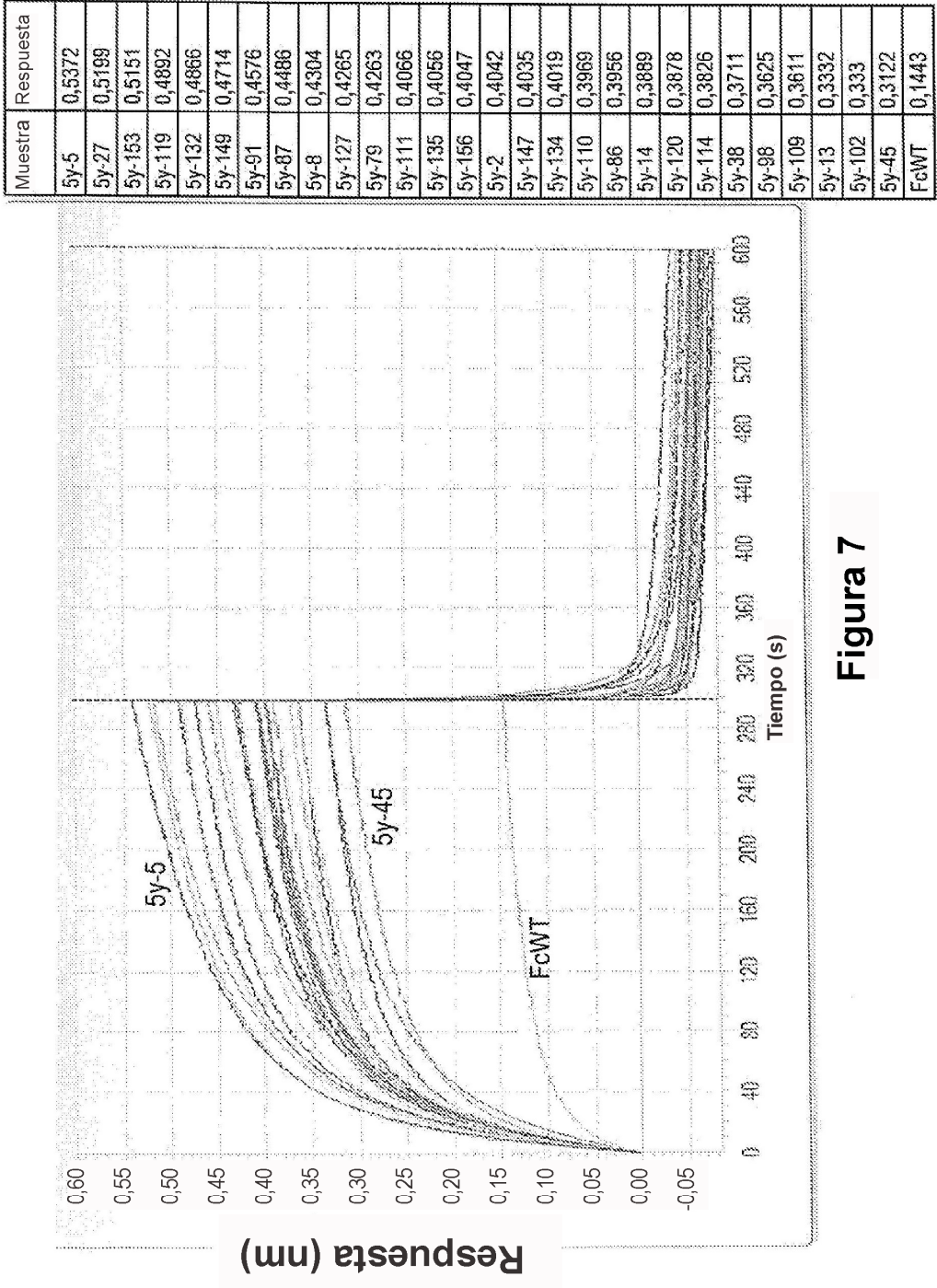


Figura 7

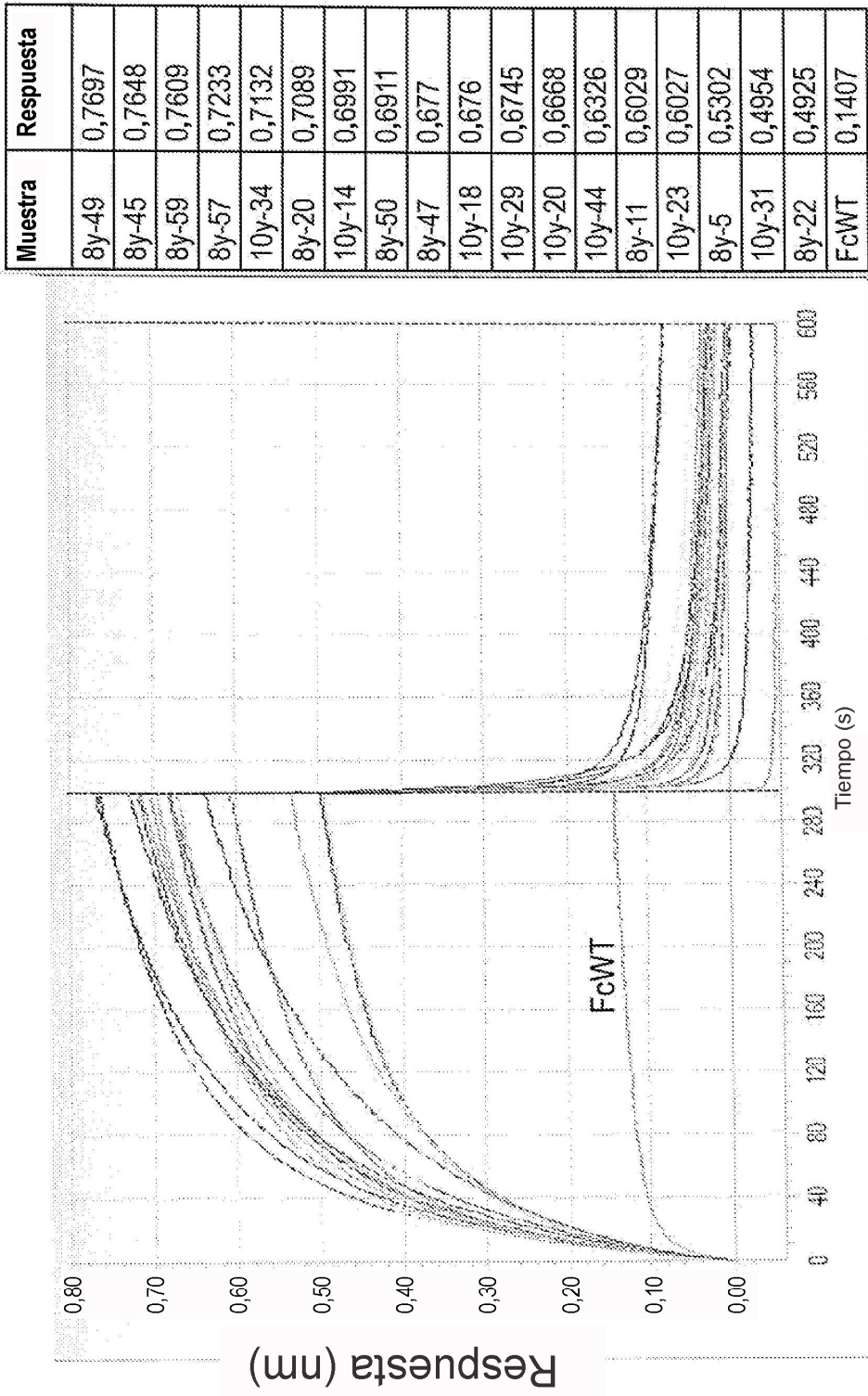


Figura 8

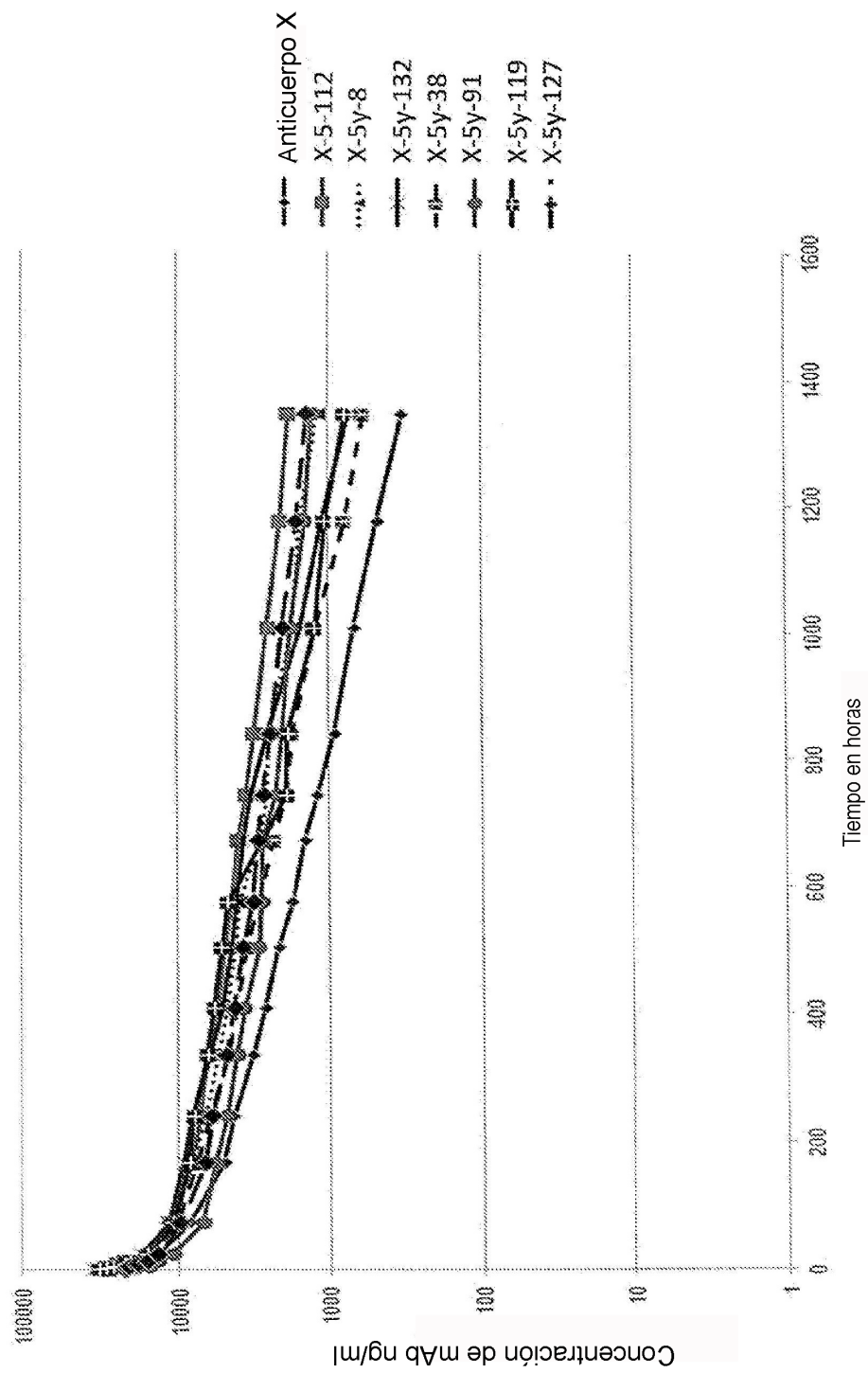
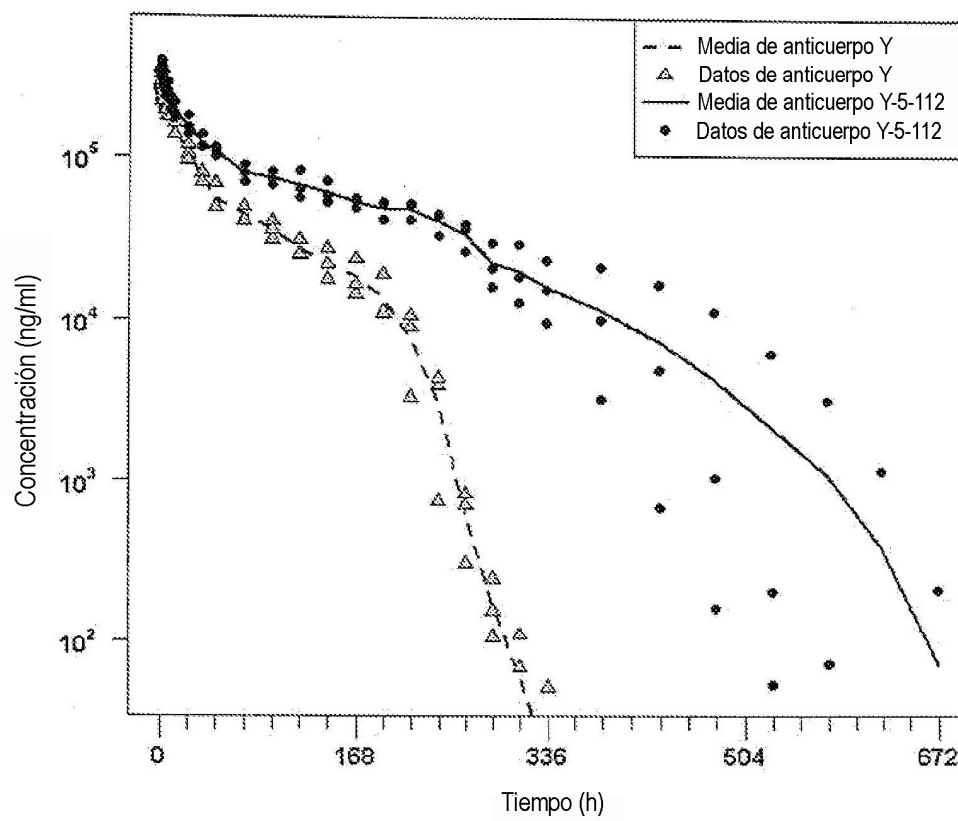


Figura 9

**Figura 10**