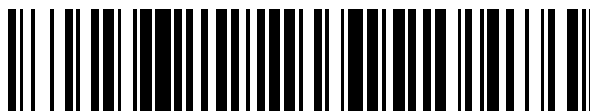


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 370**

51 Int. Cl.:

C07K 14/515 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2015 PCT/EP2015/063282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2015 E 15735638 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3155006**

54 Título: **Proteínas de fusión citolíticas humanas**

30 Prioridad:

13.06.2014 EP 14172288
13.06.2014 US 201462011921 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
08.04.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF CAPE TOWN (100.0%)
Bremner Building, Lovers Walk, Rondebosch
Cape Town 7700 , ZA

72 Inventor/es:

BARTH, STEFAN;
NACHREINER, THOMAS y
CREMER, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 370 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

Proteínas de fusión citolíticas humanas

Campo de la descripción

La tecnología proporcionada en la presente memoria se refiere a nuevas proteínas de fusión citolíticas humanas (hCFP) adecuadas para inducir apoptosis en células humanas que comprenden un componente de unión específico de célula diana y un dominio efector humano, en donde el componente de unión comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con un sitio de unión a antígeno para unirse al receptor de superficie celular CD64 y el dominio efector comprende una variante de la angiogenina humana (Ang) de tipo salvaje o un fragmento funcional de la misma; a moléculas de ácido nucleico que codifican dichas hCFP recombinantes, vectores y células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos y métodos para la preparación y producción de estas hCFP.

Antecedentes

Las inmunotoxinas (IT) son proteínas de fusión recombinantes desarrolladas originalmente para el tratamiento de enfermedades malignas. Comprenden un dominio efector tóxico fusionado a un componente de unión específico de células tumorales, que habitualmente es un anticuerpo o un derivado del mismo. Inicialmente, los componentes del anticuerpo se derivaron de ratones y las toxinas se derivaron de bacterias o plantas, p. ej., la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* exotoxina (ETA), toxina de la difteria (DT) o ricina A. La principal ventaja de las IT en comparación con la quimioterapia tradicional es su excepcional especificidad para la célula diana, pero sus desventajas incluyen los efectos secundarios causados por la potencial inmunogenicidad. Además, el desarrollo de anticuerpos neutralizantes frente a las toxinas o partes murinas de restos de unión limita el impacto del tratamiento a largo plazo debido al aclaramiento acelerado de la circulación. Se han ensayado exhaustivamente fármacos altamente tóxicos y toxinas heterólogas conjugadas con anticuerpos, pero, por ejemplo, el ADC gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda CD33+, se retiró voluntariamente del mercado debido a la aparición aumentada de muertes causadas por enfermedad hepatooclusiva después del tratamiento.

Con el fin de evitar los efectos secundarios causados por la inmunogenicidad potencial, los componentes de anticuerpos murinos han sido reemplazados por sus equivalentes humanizadas o completamente humanos y las toxinas bacterianas y vegetales han sido reemplazadas por enzimas pro-apoptóticas humanas tales como granzimas o ribonucleasas (ARNasas). La granzima B activa la cascada de caspasas, mientras que la ARNasa angiogenina (Ang) escinde el ARNt, dando lugar ambos eventos a la inducción de la apoptosis. Las proteínas de fusión que consisten en un componente de unión específico de la enfermedad (p. ej., scFv, citoquinas o ligandos peptídicos) fusionado a una enzima proapoptótica humana se conocen como 'proteínas de fusión citolíticas humanas' (hCFP) y ya han demostrado su potencial en varias aplicaciones (Stahnke, B., et al., *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(9): p. 2924-32; Huhn, M., et al., *Cancer Res*, 2001. 61(24): p. 8737-42; Krauss, J., et al., *Br J Haematol*, 2005. 128(5): p. 602-9; Schiffer, S., et al., *Antibodies*, 2013. 2(1): p. 9-18).

No obstante, la mejora de las hCFP es necesaria porque su eficacia citotóxica es mucho menor que la de las IT convencionales. En consecuencia, se necesitan dosis más altas para lograr el mismo efecto terapéutico y, por lo tanto, el riesgo de inducir una respuesta inmune asociada al tratamiento es mayor. La menor eficacia de las hCFP también puede reflejar la ausencia de dominios de translocación naturales en proteínas proapoptóticas humanas. Estos están presentes en las toxinas bacterianas y vegetales y promueven la liberación endosómica, de modo que las enzimas citotóxicas se administran al citosol. Recientemente, se ha diseñado péptidos adaptadores artificiales para promover la liberación de las hCFP de los endosomas y, de este modo, aumentar su eficacia citotóxica.

La generación de hCFP basadas en la ARNasa angiogenina (Ang) y la eliminación específica de células de poblaciones de células patológicas ha funcionado con éxito en varios estudios hasta el momento. No obstante, la CI50 de las hCFP basadas en angiogenina es significativamente mayor en diferentes líneas celulares que para IT que contienen ETA, toxina de la difteria o ricina, que están generalmente en el rango picomolar (Ribbert, T., et al., *Br J Dermatol*, 2010. 163(2): p. 279-86; Zhong, R.K., et al., *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. 10(1): p. 95-105). La mayor limitación que afecta la inhibición de la biosíntesis de proteínas por la angiogenina es la presencia de su inhibidor natural RNH1 (también conocido como RI, RNH o PRI). Esta proteína tiene una estructura en forma de herradura que se une a todos los miembros monoméricos de la familia de ARNasas pancreáticas con una afinidad extraordinaria (De Lorenzo, C., et al., *FEBS Lett*, 2007. 581(2): p. 296-300). Es una de las interacciones entre proteínas más fuertes descubiertas hasta el momento, con una $K_i \approx 10^{-13}$ para angiogenina, que ayuda a proteger a los ácidos nucleicos celulares frente a ARNasas secretoras invasoras. El complejo ARNasa-inhibidor tiene una semivida de más de 24 h, que se corresponde con el bajo valor de K_i e inhibe completamente la actividad ribonucleolítica y angiogénica de Ang. RNH1 se expresa continuamente en todos los tipos de células humanas y su abundancia es $\geq 0,01$ % del contenido total de proteína intracelular. Se localiza predominantemente en el citosol, pero también se encuentra en las mitocondrias y el núcleo donde se cree que participa en la respuesta al estrés oxidativo. La actividad citotóxica de las hCFP basadas en ARNasas depende, por lo tanto, del suministro de cantidades suficientes de ARNasa para superar la inhibición por RNH1 en el citosol.

Una limitación adicional de la angiogenina como dominio efector de CFP humana es su débil actividad enzimática hacia sustratos de ARNasa estándar en comparación con otros miembros de la superfamilia de ARNasas pancreáticas (Russo, N., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1994. 91(8): p. 2920-4).

Además, ni la ARNasa pancreática humana ni las variantes evasivas de RI de la misma demostraron ser adecuadas como componentes efectores para una plataforma terapéutica de anticuerpos IgG. Además, también existen dudas acerca de si el mecanismo efector de las ARNasas "citotóxicas" solo depende de su actividad ribonucleolítica porque no existe una correlación entre la eficiencia catalítica de diferentes ARNasas y sus propiedades citotóxicas, lo que sugiere mecanismos más complejos que la escisión inespecífica de ARN (Schirrmann, T., et al., MAbs, 2014. 6(2): p. 367-80). Más bien, el suministro citosólico de ribonucleasas, que depende del scFv utilizado y la ruta intracelular que tiene lugar después de la internalización del complejo CFP-antígeno, parece ser crucial. Por lo tanto, el scFv elegido, en combinación con la ribonucleasa, tiene que cumplir varios requisitos para adquirir la citotoxicidad de CFP que también incluye evitar la fusión del endosoma con compartimentos lisosomales intracelulares si no hay dominios de translocación disponibles explícitamente.

La publicación BERGES N et al., "Human cytolytic fusion proteins: Modified versions of human granzyme B and angiogenin have the potential to replace bacterial toxins in target therapies against CD64+ diseases", ANTIBODIES 20140219, vol. 3, no.1, 2014 describe hCFP optimizadas con versiones modificadas de angiogenina basadas en el fragmento variable de cadena única anti-CD64 H22 (scFv).

Sin embargo, la disponibilidad de proteínas de fusión citolíticas humanas (hCFP) nuevas y mejoradas sería muy ventajosa.

Resumen de la descripción

La presente invención solo se define por las reivindicaciones. Los términos "realizaciones" y "aspectos de la invención", etc., que se enumeran a continuación, son solo para fines ilustrativos.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a proteínas de fusión citolíticas humanas (hCFP) seleccionadas y altamente específicas que comprenden una variante de angiogenina efectiva o un fragmento funcional de la misma como un dominio efector humano que induce la apoptosis en combinación con un dominio de unión específico de célula diana específico y adecuado.

Por lo tanto, las realizaciones de la descripción proporcionan proteínas de fusión citolíticas humanas (hCFP) recombinantes adecuadas para inducir apoptosis en células humanas que comprenden un componente de unión específico de célula diana y un dominio efector humano, en donde el componente de unión comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con un sitio de unión a antígeno para unirse al receptor de superficie celular CD64, y el dominio efector comprende una variante o un fragmento funcional de angiogenina (Ang) humana de tipo salvaje como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto más, las realizaciones de esta descripción proporcionan ácidos nucleicos que codifican hCFP como se describe en la presente memoria, así como vectores y células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos.

En otros aspectos, esta descripción se refiere a composiciones que comprenden hCFP como se describe en la presente memoria, en donde las hCFP pueden ser útiles para, o usarse en, aplicaciones terapéuticas, cosméticas y/o de diagnóstico. En una realización ventajosa, la composición se usa como una composición terapéutica para el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto más, las realizaciones de esta descripción proporcionan medicamentos que comprenden una proteína de fusión citolítica humana (hCFP) recombinante según la presente descripción en combinaciones con un vehículo farmacológicamente aceptable.

En un aspecto adicional, las realizaciones de esta descripción se refieren a métodos para producir las hCFP en una célula huésped transformando la célula huésped con una construcción de ADN, que incluye ventajosamente un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula huésped, cultivando la célula huésped transformada en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de dichas hCFP y producir las hCFP. El método también puede incluir aislar/purificar las hCFP producidas.

Antes de que la descripción se describa en detalle, debe entenderse que esta descripción no se limita a las hCFP y a los métodos de producción particulares descritos en la presente descripción. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante. Debe indicarse que, tal y como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Además, debe entenderse que, en el caso de que se proporcionen rangos de parámetros que están delimitados por valores numéricos, se considera que los rangos incluyen estos valores de limitación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que muestra las actividades de unión de 1 µg de hCFP en células HL-60 CD64+ (A), MΦ humanos activados (B) y células L-540cy CD64- como control negativo (B). Las células se incubaron durante 15 min con las proteínas de fusión y 10 min con el anticuerpo de detección en hielo. Después de cada etapa de incubación, las células se lavaron dos veces en PBS. Clave: puntos grises, células teñidas con anti-His5 Alexa Fluor 488; gris sólido, células incubadas con H22-Ang de tipo salvaje; rayas grises, células incubadas con H22-Ang GGRR_{mut}; negro sólido, células incubadas con H22-Ang GGRR/QG_{mut}; rayas negras, células incubadas con H22-Ang QG_{mut}.

La Figura 2 (A) es una imagen de gel de agarosa, en donde se incubaron 600 ng de ARNt de levadura con varias concentraciones de hCFP durante 90 min a 37 °C. Se usaron 100 ng de ARNasa A como control positivo, mientras que se añadió agua libre de ARNasa a la muestra de control negativo. Para visualizar el proceso de degradación dependiente de la dosis, las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se detectaron bandas de fragmentos bajo luz UV. Carriles: + = control positivo, - = control negativo, 1 = 1,5 µg de hCFP, 2 = 1,0 µg, 3 = 0,5 µg, 4 = 0,25 µg. La Figura 2 (B) es un diagrama que representa las intensidades de banda de ARNt restantes en relación con las cantidades de hCFP aplicadas. La Figura 2 (C) muestra una imagen de gel de agarosa, en donde se incubaron 600 ng de ARNt de levadura con 1 µg de hCFP y 40 U de RNH1 (correspondiente a 0,6 ± 0,05 µg) para inhibir la degradación como una función de la afinidad de unión. Las otras condiciones de reacción no cambiaron. Carriles: + = control positivo, - = control negativo, 1 = sin inhibidor añadido, 2 = 40 U de RNH1 añadidas. La Figura 2 (D) es un diagrama que muestra las intensidades de banda de ARNt restantes después de 90 min de incubación con hCFP/RNH1. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism v5. Los datos se expresaron como la media ± desviación estándar (SD) como se indica. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando un ensayo de la t de Student de dos colas sin emparejar. *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001.

La Figura 3 es un diagrama que presenta la conversión de sustrato dependiente del tiempo por las diferentes variantes de Ang fusionadas a H22 (scFv) como una función de la actividad ribonucleolítica. El sustrato fue ARN acoplado a un fluoróforo y un apantallador, que se incubaron durante 3 h a 37 °C con cada variante H22-Ang. El sustrato intacto no produce una señal fluorescente a 520 nm debido a la proximidad entre el apantallador y el fluoróforo. Sin embargo, cuando ambos componentes están separados por escisión del sustrato, la señal ascendente es una función de la actividad ARNasa de la hCFP. Los datos se ajustaron utilizando el software GraphPad Prism v5.

La Figura 4 muestra dos diagramas, cada uno de los cuales representa el efecto citotóxico de las variantes de angiogenina fusionadas a H22 (scFv) en (A) células HL-60 CD64+ estimuladas con IFNγ y (B) hMΦ activados. Las células se incubaron con diluciones seriadas de cada hCFP durante 72 h a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5 %. La viabilidad celular se determinó entonces por la conversión de la sal XTT después de incubar durante 4 h. Los valores de CI50 resultantes frente a las células HL-60 fueron 10 ± 2,7 nM (H22-Ang WT), 6,7 ± 2,3 nM (H22-Ang QG_{mut}), 0,57 ± 0,14 nM (H22-Ang GGRR_{mut}) y 4,2 ± 1,8 nM (H22-Ang GGRR/QG_{mut}). Los valores de CI50 resultantes frente a MΦ humanos activados fueron 287 ± 39 pM (H22-Ang WT), 153 ± 42 pM (H22-Ang QG_{mut}), 43 ± 5,6 pM (H22-Ang GGRR_{mut}) y 75 ± 2 pM (H22-Ang GGRR/QG_{mut}).

La Figura 5 (A) es una transferencia western que muestra la cantidad de inhibidor encontrada en las células diana. Los lisados celulares de HL-60 y MΦ activado se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. RNH1 se detectó específicamente mediante imagenología de quimioluminiscencia ECL (bandas de proteínas blancas). Las bandas de proteínas oscuras son β-actina, detectada por la conversión posterior de un sustrato de peroxidasa DAB. La igualdad de la carga se verificó por la cantidad comparable de β-actina en cada muestra. Carriles: M: marcador de proteína pre-teñido NEB, 1: células HL-60 estimuladas con IFNγ, 2: hMΦ activados. La Figura 5 (B) muestra el contenido de proteína correspondiente, mientras que las intensidades de las bandas se analizaron por densitometría 2D y el contenido de RNH1 para cada muestra se normalizó a 100 U de β-actina. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism v5. Los datos se expresaron como la media ± desviación estándar (SD) como se indica. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando un ensayo de la t de Student de dos colas sin emparejar. *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos utilizada de la angiogenina humana de tipo salvaje sin secuencia de péptido señal N-terminal (SEQ ID NO.1).

La Figura 7 muestra secuencias de aminoácidos de realizaciones de proteínas de fusión citolíticas (hCFP) de acuerdo con la presente descripción. H22-Ang WT (SEQ ID NO.2), H22-Ang GGRR_{mut} (SEQ ID NO.3), H22-Ang QG_{mut} (SEQ ID NO.4) y H22-Ang GGRR/QG_{mut} (SEQ ID NO.5). Subrayado = H22 (scFv), punteado = Ang WT o Ang-variante.

Descripción detallada de esta descripción

La presente descripción proporciona nuevas proteínas de fusión citolíticas humanas (hCFP) recombinantes adecuadas para inducir apoptosis en células que expresan CD64 humano que comprenden un componente de unión específico de célula diana y un dominio efector humano, en donde el componente de unión comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con un sitio de unión a antígeno para unirse al receptor de superficie celular CD64, y el dominio efector comprende una variante o un fragmento funcional de angiogenina (Ang) humana de tipo salvaje como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Las realizaciones ventajosas de la presente descripción se refieren a proteínas de fusión citotóxicas humanas (hCFP) recombinantes adecuadas para inducir apoptosis en células humanas que comprenden un componente de unión específico de célula diana y un dominio efector humano, en donde el componente de unión comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con un sitio de unión a antígeno para unirse al receptor de superficie celular CD64, y el dominio efector comprende una variante o un fragmento funcional de angiogenina (Ang) humana de tipo salvaje como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

La actividad enzimática *in vitro* de las hCFP según la presente descripción se demostró usando un ensayo de sustrato de ARNt de levadura (Figura 2A y B). Los resultados muestran que la enzima de tipo salvaje y el mutante G85R/G86R tienen niveles similares de actividad ARNasa. La variante de Ang Q117G es más enzimáticamente activa porque la accesibilidad del centro activo para el sustrato se mejora mediante la eliminación de un residuo obstructor. Por el contrario, el tipo salvaje y las versiones mutantes G85R/G86R deben someterse a una reorganización conformacional para descubrir su centro activo y hacerlo disponible para una unión eficiente del sustrato. Sorprendentemente, la combinación de G85R/G86R y Q117G (Ang GGRR/QG_{mut}) demostró una actividad de ARNasa aún mayor que Ang QG_{mut}. Por lo tanto, la combinación de intercambios de aminoácidos tiene un impacto sinérgico en la estructura enzimática tridimensional, facilitando la unión del sustrato, mejorando la accesibilidad del centro activo y quizás incluso aumentando la actividad enzimática. La actividad ARNasa de cada variante de Ang se confirmó monitorizando la cinética de degradación del ARN (Figura 3). Este procedimiento, basado en la digestión con un fluoróforo y un apantallador acoplados, permite la caracterización sensible de la actividad ARNasa. La nueva variante de angiogenina GGRR/QG_{mut} logra una actividad de escisión del sustrato que es más alta que para cualquier otro mutante de Ang descrito en la técnica anterior. La susceptibilidad de inhibición para cada variante de Ang hacia RNH1 se determinó mediante la adición del inhibidor a 1 µg de CFP (Figura 2C). Los resultados muestran que la eficiencia de degradación de H22-Ang GGRR_{mut} refleja claramente su menor sensibilidad hacia RNH1 (Figura 2D). Sorprendentemente, H22-Ang GGRR/QG_{mut} mostró una actividad similar frente al ARNt de levadura que la enzima de tipo salvaje y el mutante QG. La baja actividad de GGRR/QG_{mut} en presencia del inhibidor, a pesar de su alta actividad intrínseca, sugiere que su sensibilidad hacia RNH1 es comparable a la enzima de tipo salvaje. Por lo tanto, una superficie de unión adecuada para RNH1 puede restaurarse mediante la combinación de las mutaciones GGRR y QG en un único dominio de polipéptido.

Los resultados presentados aquí documentan una actividad funcional impredeciblemente alta del ligando de unión anti-C64 con el mutante de Ang GGRR incluso superando a la combinación de Ang GGRR/QG_{mut}. Esta actividad funcional excepcional del mutante GGRR con otros ligandos que se unen a las moléculas de la superficie celular internalizadoras no se ha confirmado con anticuerpos de cadena única que se unen, p. ej., al receptor del factor de crecimiento epidérmico, CD30, CD33 o CD123 (datos no mostrados).

El término "componente de unión específica de célula diana" usado en la presente memoria comprende polipéptidos que tienen una actividad de unión para estructuras de la superficie celular. Por ejemplo, los ligandos basados en polipéptidos pueden proporcionarse con un resto de direccionamiento celular que es un resto que se une a y/o se internaliza solo por una población seleccionada de células, tales como las células que expresan el receptor celular CD64. Dicho direccionamiento celular puede, por ejemplo, comprender un anticuerpo, un factor de crecimiento, una hormona, una citoquina, un aptámero o un avímero que se une a una proteína de la superficie celular. Los ejemplos de restos de unión comprendidos en el ligando son restos de afinidad de sustancias de afinidad o sustancias de afinidad en su totalidad seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ligandos de receptor, sustratos enzimáticos, lectinas, citoquinas, linfoquinas, interleuquinas, factores angiogénicos o de virulencia, alérgenos, alérgenos peptídicos, alérgenos recombinantes, anticuerpos alérgénicos-idiotípicos, estructuras que provocan autoinmunidad, estructuras inductoras de rechazo de tejidos, regiones constantes de inmunoglobulina y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos. En particular, el componente de unión específico de célula diana se une específicamente a CD64.

En una realización ventajosa, el componente de unión específico de célula diana es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, Fab, scFv; dominio único, o un fragmento del mismo, bis scFv, Fab2, Fab3, minicuerpo, diacuerpo, triplecuerpo, tetracuerpo y tandab.

En una realización ventajosa, el componente de unión específico de célula diana es un anticuerpo humano o un fragmento de anticuerpo humano que se une específicamente a CD64.

Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento

del antígeno. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que es una cadena ligera unida a V_HCH_1 por un enlace disulfuro. El $F(ab')_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo así el dímero $(Fab')_2$ en dos monómeros Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Si bien varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos Fab' pueden sintetizarse *de novo* ya sea químicamente o utilizando tecnología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, tal y como se usa en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos de cadena única (anticuerpos que existen como una única cadena de polipéptidos), más preferiblemente anticuerpos de cadena única Fv (scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o a través de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo de cadena única Fv es un heterodímero V_H-V_L unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificadoras de V_H y V_L unidas directamente o unidas por un conector codificador de péptido. Huston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883. Mientras que las V_H y V_L están conectadas entre sí como una cadena polipeptídica única, los dominios V_H y V_L se asocian de manera no covalente.

Un "sitio de unión a antígeno" o "resto de unión" en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesadas ("H") y ligeras ("L"). Tres cadenas altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras se denominan "regiones hipervariables" que se interponen entre cadenas flanqueantes más conservadas conocidas como "regiones marco" o "FR". Así, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre y adyacentes a regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas entre sí en un espacio tridimensional para formar una "superficie" de unión a antígeno. Esta superficie media el reconocimiento y la unión del antígeno diana. Las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" y se caracterizan, por ejemplo, por Kabat et al. Sequences of proteins of immunological interest, 4ª ed. U.S. Dept. Health and Human Services, Public Health Services, Bethesda, Md. (1987).

Por ejemplo, en realizaciones ventajosas de la presente descripción, el componente de unión específico de célula diana que es capaz de unirse específicamente a CD64 es un anticuerpo. En general, el término anticuerpo incluye, pero no está limitado a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, anticuerpos humanizados, minicuerpos, diacuerpos, triplecuerpos, así como fragmentos de anticuerpos, tales como Fab', Fab, $F(ab')_2$, anticuerpos de dominio único.

La expresión "se une específicamente a CD64" se refiere a una reacción de unión, que es determinante de la presencia de la proteína CD64 en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos especificados se unen a CD64 y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a una proteína en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se selecciona por su especificidad para CD64.

Los términos "polipéptido", "péptido" o "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para designar una serie lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de residuos adyacentes. Los residuos de aminoácidos están preferiblemente en la forma isomérica "L" natural. Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" se pueden sustituir por cualquier residuo de L-aminoácido, siempre que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada. Además, los aminoácidos, además de los 20 aminoácidos "estándar", incluyen aminoácidos modificados e inusuales.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpos humanos" o "fragmento de anticuerpo humano" significa que las regiones marco de una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos de anticuerpos de cadena única" (scFv) se refiere a anticuerpos preparados determinando los dominios de unión (tanto cadenas pesadas como ligeras) de un anticuerpo de unión, y suministrando un resto conector, que permite la preservación de la función de unión. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene solo esa parte del dominio variable necesaria para unirse al antígeno. La determinación y construcción de anticuerpos de cadena única se describen en la Pat. de EE. UU. No. 4.946.778 de Ladner et al.

El "dominio efector humano", aquí también llamado "dominio de muerte celular" de la hCFP es una variante/mutante de la angiogenina humana. La angiogenina es una enzima activada por el estrés de 14 kDa, también conocida como ARNasa 5, que actúa como un potente estimulador de la neovascularización y comparte una identidad de secuencia del 33 % con la ARNasa A pancreática. Dependiendo de la densidad celular y de los factores de estrés, la Ang sufre una translocación nuclear rápida debido a la presencia de una señal de localización nuclear N-terminal. En condiciones fisiológicas, la angiogenina actúa como un factor de transcripción para el ARN ribosómico (ARNr) y, de esta manera, aumenta la biosíntesis de los componentes necesarios para el crecimiento de los vasos sanguíneos, así como el desarrollo del tumor primario y la metástasis. Por el contrario, la misma molécula puede inhibir la síntesis de proteínas libres de células escindiendo el ARNr 5S, 18S y 28S, así como el ARN de transferencia (ARNt). Este proceso de degradación conduce a la inactivación de los ribosomas y a la producción de ARN inducidos por el estrés derivados de ARNt (ARNti), que desplazan eIF4G/A de los ARN mensajeros (ARNm) con y sin caperuza, así como eIF4F de la caperuza m7G, lo que finalmente resulta en represión de la traducción. La secuencia de aminoácidos de la angiogenina humana de tipo salvaje sin la secuencia líder N-terminal (aminoácidos 1-24) se muestra en la SEQ ID NO.1.

En realizaciones ventajosas, la variante de la angiogenina humana de tipo salvaje como se muestra en SEQ ID NO: 1 contiene al menos una sustitución en una posición que corresponde estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos a la posición 117, y en donde la sustitución es Q117G.

En otra realización ventajosa, la variante de la angiogenina humana de tipo salvaje como se muestra en SEQ ID NO: 1 contiene al menos dos sustituciones adicionales en posiciones que corresponden estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos a las posiciones 85 y 86, y en donde las sustituciones son G85R y G86R.

En particular, la proteína de fusión citolítica humana recombinante según el presente comprende una variante de la angiogenina humana de tipo salvaje como se muestra en SEQ ID NO: 1, en donde la variante contiene al menos sustituciones en posiciones que corresponden estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos a las posiciones 85, 86 y 117, y en donde las sustituciones son G85R, G86R y Q117G.

Por lo tanto, las realizaciones ventajosas se refieren a proteínas de fusión citolíticas humanas recombinantes según la presente descripción, en donde la variante de la angiogenina humana de tipo salvaje que tiene una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la angiogenina humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante comprende al menos una variación en comparación con la SEQ ID NO: 1, en donde la variación es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en G85R, G86R y Q117G, y en donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización ventajosa adicional, las variantes de la angiogenina humana de tipo salvaje comprenden las sustituciones G85R, G86R y Q117G.

En realizaciones adicionales, las variantes son al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

El término "fragmento funcional de angiogenina humana de tipo salvaje" debe interpretarse como que significa cualquier fragmento de angiogenina humana de tipo salvaje que tenga la función deseada. En relación con la modulación de la actividad enzimática, un fragmento funcional es un fragmento capaz de modular la actividad enzimática. La presente descripción también comprende fragmentos funcionales de la angiogenina humana de tipo salvaje, en donde los fragmentos funcionales comprenden la misma mutación que las variantes de angiogenina descritas en la presente memoria y son capaces de escindir ARNr 5S, 18S y 28S, así como ARN de transferencia (ARNt). Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto del fragmento funcional puede ser diferente del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, el fragmento funcional puede ser de hecho más efectivo que la molécula de longitud completa. Además, el uso de fragmentos en lugar de moléculas de longitud completa puede ser ventajoso en vista del menor tamaño de los fragmentos.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "CD64" se refiere a una molécula de superficie humana como se ha revisado de forma extensa anteriormente. Para fines de inmunización, el antígeno CD64 puede prepararse mediante cualquier técnica conocida en la técnica.

Los anticuerpos frente a CD64 humano son conocidos en la técnica. La presente invención también contempla un nuevo uso de derivados recombinantes de dichos anticuerpos como se detalla anteriormente.

Alternativamente, se pueden producir anticuerpos monoclonales anti-CD64 humano usando la unión del antígeno CD64 a un Fc irrelevante como inmunógeno, siempre que esté disponible un ensayo de cribado que distinga los anticuerpos dirigidos frente a otros antígenos presentes en la composición inmunogénica. También pueden usarse células o fracciones de membrana que contengan la molécula de interés unida a un Fc irrelevante como inmunógenos con el fin de preservar las restricciones conformacionales proporcionadas por un entorno de membrana. La inmunización de animales con células enteras o fracciones de las mismas rinde generalmente una respuesta inmune fuerte, que genera anticuerpos frente a una gran cantidad de moléculas diferentes. Esta amplia respuesta inmune impide el uso de las células CD64+ en combinación con el antígeno CD64 purificado, ambos unidos a un Fc irrelevante en el cribado posterior para la producción de anticuerpos específicos por clones de hibridoma derivados del bazo o linfocitos de ratón.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "muerte de células que expresan CD64" debe entenderse como que implica una inhibición de la síntesis de proteínas o la inducción de apoptosis que da como resultado la eliminación o muerte de estas células; pueden emplearse diversos mecanismos moleculares; por ejemplo, pueden usarse mecanismos que alteran la función de una célula, aquellos que alteran el patrón de expresión génica de una célula o aquellos que afectan directamente la viabilidad de una célula.

Tal y como se usa en la presente memoria, la expresión "células que expresan CD64" se refiere a células con CD64 como antígeno de superficie. CD64 se expresa principalmente en monocitos, macrófagos y células presentadoras de antígenos (APC). Se puede considerar cualquier tipo de célula que exprese CD64 para el tratamiento con la hCFP recombinante o composiciones que comprenden lo mismo de la presente descripción.

Una "célula diana" se refiere a una célula o tipo de célula para la que se busca un anticuerpo internalizante, fragmento de anticuerpo o (poli)péptido de unión. La célula diana se caracteriza típicamente por la expresión o sobreexpresión de la molécula diana CD64 que es característica, p. ej., de algunas células tumorales como las células de la línea celular de leucemia HL-60. Por lo tanto, la hCFP recombinante según la presente descripción puede usarse en diferentes indicaciones como el tratamiento de enfermedades malignas, alergias, enfermedades inflamatorias crónicas, tales como leucemia mieloide aguda, artritis, EPOC incluyendo enfisema, asma intrínseco y extrínseco; enfermedad cutánea que incluye dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, LES; enfermedades autoinmunes, incluyendo injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil; enfermedades intestinales, incluyendo la enfermedad de Crohn y la enfermedad intestinal crónica.

Una proteína de fusión, en general, es una molécula quimérica en la que las moléculas constituyentes son todos polipéptidos y están unidas (fusionadas) entre sí a través de enlaces peptídicos terminales, de modo que la molécula quimérica es un polipéptido continuo de cadena única. Los diversos constituyentes pueden unirse directamente entre sí o pueden acoplarse a través de uno o más conectores peptídicos. En general, una molécula quimérica es una molécula en la que dos o más moléculas que existen por separado en su estado nativo se unen entre sí para formar una única molécula que tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes. Si bien la molécula quimérica se puede preparar uniendo covalentemente dos moléculas, cada una sintetizada por separado, un experto en la técnica apreciará que cuando la molécula quimérica es una proteína de fusión, la quimera se puede preparar *de novo* como una única molécula "unida".

La proteína de fusión según la presente descripción comprende un componente de unión específico de célula diana capaz de unirse a un epítipo de CD64.

En particular, la hCFP puede ser un polipéptido "recombinante", que se define bien por su método de producción o su estructura. En referencia a su método de producción, p. ej., un producto preparado por un proceso, el proceso involucrado usa técnicas de ácido nucleico recombinante. En referencia a la estructura, los polinucleótidos o polipéptidos recombinantes contienen secuencias de diferentes fuentes. En particular, engloba polipéptidos preparados mediante la generación de una secuencia que comprende dos o más fragmentos, que no son contiguos de forma natural ni están unidos operativamente entre sí. Así, por ejemplo, se engloban los productos preparados mediante la transformación de células con cualquier vector de origen no natural. El término también puede interpretarse que significa proteína de fusión que ha sido generada por la síntesis de una molécula de ADN que codifica la proteína de fusión y dicha molécula de ADN expresa una proteína de fusión, o una secuencia de aminoácidos que especifica la proteína de fusión, en donde la secuencia de ADN o aminoácidos se ha obtenido usando tecnología sintética de secuencias de ADN o aminoácidos que está disponible y es bien conocida en la técnica. En una realización, la proteína de fusión según la presente descripción es una proteína de fusión recombinante y/o sintética.

Además, las secuencias de nucleótidos codificadoras pueden sintetizarse *in vitro* sin la necesidad de muestras de ADN molde iniciales, p. ej., mediante la síntesis de oligonucleótidos a partir de secuencias genéticas digitales y la hibridación posterior de los fragmentos resultantes. Las secuencias de proteínas deseadas se pueden "traducir inversamente", p. ej., utilizando herramientas de software apropiadas. Debido a la degeneración del código genético universal, los codones sinónimos dentro del marco de lectura abierta (es decir, la región de codificación de proteínas recombinantes) se pueden intercambiar de diferentes maneras, p. ej., para eliminar elementos de inestabilidad que actúan en cis (p. ej., AUUUA), para eliminar, introducir o modificar las estructuras de ARNm secundarias y terciarias (p. ej., pseudonudos, tallo-bucle), para evitar regiones autocomplementarias que puedan desencadenar el silenciamiento génico postranscripcional (PGTS), para cambiar el contenido global de AT:GC o para ajustar el uso de codones para el huésped de expresión. Dichos cambios pueden diseñarse manualmente o mediante el uso de herramientas de software apropiadas o mediante una combinación.

En algunas realizaciones, la estructura de unión de la proteína de fusión es un dominio de unión de anticuerpo o péptido para la unión del ligando. La estructura de unión puede comprender un dominio variable derivado de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión a antígeno completo para un epítipo en el CD64 diana en una única cadena de polipéptido. En una realización ventajosa, la estructura de unión de la proteína de fusión es un fragmento de anticuerpo de dominio único. Los ejemplos de dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos son anticuerpos que reconocen específicamente un epítipo que está presente en la cadena ligera kappa o lambda de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos. En este ejemplo, el anticuerpo humano es el ligando. Los anticuerpos humanos comprenden dos cadenas ligeras kappa, que comprenden los

epítomos.

En realizaciones ventajosas, la proteína de fusión citolítica humana (hCFP) comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. (Mutante GGRR).

5 En realizaciones adicionales, la presente descripción se refiere a hCFP que son al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Las realizaciones adicionales de la presente descripción se refieren a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una hCFP según la presente descripción.

10 Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico, tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el ligando, por ejemplo, el anticuerpo
15 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

Para expresar una proteína de fusión según la presente descripción en un sistema de expresión recombinante, un ADN que codifica la proteína de fusión o partes de la misma, puede insertarse en un vector de expresión de modo que el gen esté operativamente unido a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el
20 término "operativamente unido" significa que un gen de proteína está ligado en un vector de tal manera que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de la proteína. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. Las secuencias de dominio de proteínas aisladas se insertan típicamente en el mismo vector de expresión. Los genes de la proteína se insertan en el vector
25 de expresión por métodos estándar. Además, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la translocación co-traducciona de la cadena polipeptídica nascente en el retículo endoplásmico (RE). El polipéptido plegado (proteína de fusión recombinante según esta descripción) puede secretarse de una célula huésped o puede retenerse dentro de la célula huésped. La retención o direccionamiento intracelular se puede lograr mediante el uso de un péptido de direccionamiento apropiado, tal como la etiqueta KDEL C-terminal para la recuperación del
30 RE.

En general, los expertos en la técnica son capaces de construir vectores y diseñar protocolos para la expresión de genes recombinantes. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press (o ediciones posteriores de este trabajo) y Current Protocols in Molecular Biology, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

35 Además, la presente descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican dicha proteína de fusión, así como a vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico y las células huésped que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión o un vector que comprende dicho vector. La descripción también se refiere a métodos de fabricación de dichas proteínas de fusión recombinantes en un sistema de expresión recombinante.

40 El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle circular de ADN bicatenario en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p. ej., vectores no episomales de mamíferos) pueden integrarse en el genoma de una
45 célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "sistema de expresión recombinante" o "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante a menudo están en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y
50 "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más usada. Sin embargo, la descripción pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (p. ej., retrovirus con defectos de replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

55 La presente descripción también está dirigida a una célula huésped con un vector que comprende las proteínas de fusión recombinantes según la presente descripción. La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones siguientes debido bien a

mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" tal y como se usa en la presente memoria.

Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye una célula transfectada o infectada *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la presente descripción. Una célula huésped, que comprende un vector recombinante de la descripción, también puede denominarse una "célula huésped recombinante".

El término "célula(s) huésped" se refiere a la o las células, que pueden usarse en un proceso para purificar una proteína recombinante según la presente descripción. Dichas células huésped portan la proteína de interés (POI). Una célula huésped también puede denominarse una célula que expresa proteínas. Una célula huésped, según la presente invención, puede ser, pero no está limitada a, células procariotas, células eucariotas, arqueobacterias, células bacterianas, células de insectos, levaduras, células de mamíferos y/o células vegetales. Las bacterias concebidas como células huésped pueden ser bien gram-negativas o gram-positivas, p. ej., *Escherichia coli*, *Erwinia sp.*, *Klebsellia sp.*, *Lactobacillus sp.* o *Bacillus subtilis*. Las células huésped de levadura típicas se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris*. En algunas realizaciones ventajosas, la célula huésped es una célula HEK293T.

La proteína de fusión citolítica humana (hCFP) recombinante de la presente descripción se puede usar con un "vehículo farmacéuticamente aceptable" que incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes que retrasan la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sería conocido por un experto en la técnica.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable se formula preferiblemente para la administración a un ser humano, aunque en ciertas realizaciones puede ser deseable usar un vehículo farmacéuticamente aceptable que se formula para la administración a un animal no humano, tal como un canino, pero que no sería aceptable (p. ej., debido a regulaciones gubernamentales) para la administración a un ser humano. Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

La cantidad de dosificación real de una composición de la presente descripción administrada a un sujeto puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y la ruta de administración. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente o ingredientes activos en una composición y la o las dosis apropiadas para el sujeto individual.

En realizaciones ventajosas, las proteínas de fusión citolíticas humanas recombinantes según la descripción se usan para tratar una enfermedad maligna, una alergia, enfermedad autoinmune, reacción de rechazo de tejido o reacción de inflamación crónica.

Los siguientes métodos y ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción de ninguna manera.

Métodos y ejemplos

Debe entenderse que los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de esta descripción de ninguna manera.

1. Mutagénesis dirigida a sitio

La secuencia H22-Ang de tipo salvaje se insertó en el vector de expresión pMS (Stocker, M., et al., Protein Expr Purif, 2003, 28(2): p. 211-9) y se modificó por mutagénesis dirigida a sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange II XL (Agilent Technologies, Boblingen, Alemania). Los siguientes oligonucleótidos de intercambio fueron sintetizados por Eurofins (Ebersberg, Alemania) y se usaron para la mutagénesis por PCR: GRR_{mut} dir (5'-CCA CTT GCA AGC TAC ATC GGC GCT CCC CCT GGC CTC CAT GCC-3'), GRR_{mut} inv (5'-GGC ATG GAG GCC AGG GGG AGC GCC GAT GTA GCT TGC AAG TGG-3'), QG_{mut} dir (5'-CCT GTC CAC TTG GAT GGA TCA ATT TTC CGT CG-3') y QG_{mut} inv (5'-CGA CGG AAA ATT GAT CCA TCC AAG TGG ACA GG-3'). La temperatura de hibridación fue de 75 °C para la mutación GRR y 57 °C para el intercambio de QG. Las mutaciones se verificaron mediante secuenciación de ADN utilizando un analizador de ADN ABI Prism 3700 y la química del terminador de secuenciación del ciclo BigDye (Applied Biosystems, Carlsbad, EE. UU.).

2. Cultivo celular y expresión de hCFP

Las células HL-60 (ATCC, CCL-240) y L-540cy (amablemente proporcionadas por el Prof. Dr. med. Andreas Engert, University Hospital Cologne, Alemania) se cultivaron en condiciones estándar (medio RPMI 1640, suero de ternera fetal al 10 %, 37 °C, CO₂ al 5 %) sin selección (Gallagher, R., et al., Blood, 1979. 54(3): p. 713-33; Diehl, V., et al., Cancer Res Clin Oncol, 1981. 101(1): p. 111-24). Otras células se cultivaron como se ha descrito anteriormente (Dmitrij Hristodorov, CD64-mediated specific elimination of M1-polarized macrophages: implications for therapeutic intervention in chronic inflammatory diseases, tesis doctoral, 2013, RWTH Aachen, <http://darwin.bth.rwth-aachen.de/opus/volltexte/2013/4705/>). Los vectores de expresión pMS se usaron para la transfección de células HEK293T (ATCC, Wesel, Alemania, CRL-11268) usando Roti®-Fect (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 2 µg de ADN con 10 µl de Roti®-Fect y se aplicaron a las células durante 4 h. Para la selección, los cultivos se suplementaron con 100 ng/ml de Zeocin® (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.).

3. Purificación de hCFP

Los hCFP recombinantes se purificaron del sobrenadante del cultivo celular mediante IMAC usando un cartucho Superflow Ni²⁺-NTA de 5 ml (Qiagen, Hilden, Alemania) en un sistema purificador ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). Las fracciones de elución se agruparon y se concentraron usando columnas Vivaspin 6 (Sartorius, Goettingen, Alemania). Después de diálisis durante la noche frente a 1 x PBS a 4 °C, las hCFP se pasaron a través de un filtro estéril de 0,22 µm (Nalgene, Roskilde, Dinamarca). La concentración de proteína se estimó mediante SDS-PAGE y la tinción con azul brillante de Coomassie seguido de análisis de imágenes utilizando el paquete de software de bio AIDA (Raytest GmbH, Straubenhardt, Alemania) frente a estándares de 0,25-3 µg de albúmina de suero bovino (BSA).

La mutagénesis dirigida a sitio exitosa de la secuencia de ADN de angiogenina de tipo salvaje se verificó mediante secuenciación. Los vectores de expresión correspondientes se introdujeron con éxito en células HEK293T como se muestra por la expresión del gen indicador eGFP y la supervivencia de células transfectadas bajo presión de selección. La expresión de las hCFP y su secreción en el sobrenadante del cultivo celular se confirmó mediante análisis de citometría de flujo de células HL-60 estimuladas con hIFN γ (datos no mostrados). Se estimó que la pureza de la proteína era un 60-90 % sobre la base de la tinción del gel con azul brillante Coomassie y análisis por AIDA de las intensidades de banda. Los rendimientos de la expresión calculados estaban entre 360 mg y 2,3 mg por litro de sobrenadante de cultivo celular (Tabla 1).

Tabla 1: Rendimientos de la expresión de variantes de H22-Ang

hCFP	rendimiento/l
H22-Ang WT	1,9 mg
H22-Ang GGRR _{mut}	360 µg
H22-Ang QG _{mut}	2,3 mg
H22-Ang GGRR/QG _{mut}	1,7 mg

4. Citometría de flujo

La unión de las hCFP a 6 x 10⁵ células HL-60 CD64+ (estimuladas con 300 U/ml de IFN γ 24 h antes) se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo BD FACSVerser (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) y el software de análisis BD FACSuite. Brevemente, las células se incubaron con 1 µg de hCFP purificada durante 15 min y 1 µg/ml de anticuerpo anti-His5 Alexa Fluor 488 (Qiagen, Hilden, Alemania) durante 10 min, en cada caso en hielo con lavados intermedios en 1,8 ml de 1 x PBS. Las células L-540cy se usaron como control negativo. Se cultivaron MΦ humanos y se activaron como se describe a continuación.

La actividad específica e incluso de unión se verificó por citometría de flujo después de aplicar 1 µg de cada hCFP sobre células HL-60 estimuladas con hIFN γ y hMΦ activados (Figura 1). Se descartó la unión inespecífica porque no hubo desplazamiento de fluorescencia cuando las células L-540cy se expusieron a las hCFP como control negativo.

5. Aislamiento y activación de hMΦ de PBMC derivadas de la capa leucoplaquetaria

Las capas leucoplaquetarias se obtuvieron del Department of Transfusion Medicine, University Hospital RWTH Aachen, Alemania. Se aislaron las PBMC y los MΦ se activaron como se ha descrito anteriormente (Schiffer, S., et al., Antibodies, 2013. 2(1): p. 9-18). El desprendimiento de las células se realizó mediante la adición de 1 ml de acutasa (PAA Laboratories, Pachingen, Austria) por matraz T175 e incubación a 37 °C hasta que no quedaron células adherentes.

6. Ensayos de ARNasa *in vitro* e inhibición

La actividad ARNasa de las proteínas de fusión se evaluó por degradación de ARNt *in vitro*. Brevemente, se incubaron

diferentes cantidades de cada hCFP (0,25-1,5 μ g) con 600 ng de ARNt de levadura (Sigma, Steinheim, Alemania) en 20 μ l de tampón (Tris/NaCl 30 mM libre de ARNasa, pH 7,5) durante 1,5 h usando un equipo libre de ARNasa. Se preparó tampón TAE 1 x con agua tratada con DEPC al 1 % (Carl Roth) y se usó para preparar geles de agarosa al 1 % que contenían 0,1 μ g/ml de bromuro de etidio y como el tampón de operación. Se preparó un tampón de carga 5 x como se ha descrito anteriormente (Huhn, M., et al., Cancer Res, 2001. 61(24): p. 8737-42). Se usó tampón que contenía 100 ng de ARNasa A (Thermo Scientific, Schwerte, Alemania) como control positivo y se usó el mismo volumen de agua tratada con DEPC como control negativo. La electroforesis se realizó a 100 V durante 10 min y las bandas se visualizaron mediante iluminación UV. La susceptibilidad a la inhibición se demostró añadiendo 40 U de RNH1 comercial (correspondiente a $0,6 \pm 0,05 \mu$ g) a 1 μ g de CFP mientras se mantenían las condiciones de la reacción. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism v5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Los datos se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (SD) como se indica. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando un ensayo de la t de Student de dos colas sin emparejar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

La actividad ARNasa de cada hCFP se ensayó *in vitro* incubando diferentes cantidades de cada proteína de fusión (0,25-1,5 μ g) con 600 ng de ARNt de levadura a 37 °C durante 1,5 h. Para investigar la susceptibilidad de cada variante a la inhibición, se mezclaron 40 U de inhibidor comercial RNH1 con 1 μ g de CFP y se ensayó la actividad ARNasa como se ha descrito anteriormente. Según el ensayo de escisión, las otras condiciones de reacción no cambiaron, y esto demostró que la actividad de escisión del ARNt era una función de la afinidad del inhibidor (Figura 2).

Las variantes QG_{mut} y GGRR/QG_{mut} mostraron una actividad de escisión más potente que la versión de tipo salvaje cuando se presentaron con ARNt de levadura como sustrato. Incluyendo las desviaciones estándar, GGRR_{mut} y Ang de tipo salvaje no mostraron diferencias significativas en la conversión del sustrato. Sin embargo, en presencia de RNH1, el mutante GGRR mostró la actividad de escisión más fuerte y se observaron eficiencias comparativamente bajas para todas las demás variantes.

7. Determinación de la cinética de escisión del sustrato

Incubamos sustrato RNaseAlert 5 pM (Integrated DNA Technologies, Lovaina, Bélgica) con hCFP 10 pM durante 180 min a 37 °C en Tris/NaCl 30 mM libre de ARNasa (pH 7,5) en un volumen de reacción total de 100 μ l. Los experimentos se llevaron a cabo en triplicado y se utilizó H22(scFv) 10 pM en lugar de las hCFP como control negativo. Las muestras que contenían ARNasa 10 fM se usaron como control positivo. La fluorescencia se midió utilizando el lector de microplacas "Tecan Genios Pro" y el software Magellan 7.1 SP1, con una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Las mediciones se tomaron cuatro veces por pocillo a intervalos de 3 min. Entre cada ciclo, la placa se agitó durante 20 s en modo orbital con una amplitud de 5 mm. La evaluación final de los datos se realizó con el software GraphPad Prism v5.

La cinética de escisión se analizó para cada hCFP usando un sustrato de ARN con un fluoróforo y un apantallador acoplados. La separación de los fluoróforos durante la escisión del sustrato previene un mayor apantallamiento y permite la detección de fluorescencia a 520 nm (Figura 3). Se usaron controles negativos y positivos para establecer las señales de fluorescencia esperadas correspondientes al apantallamiento completo y sin apantallamiento (datos no mostrados). Mientras que la Ang de tipo salvaje y la variante GGRR revelaron una conversión de sustrato bastante moderada, se pudo detectar un aumento en la actividad enzimática usando la variante QG. La fluorescencia más alta en el tiempo pudo observarse para GGRR/QG_{mut}, que se correlaciona directamente con su fuerte conversión de sustrato. Estos resultados pueden alinearse con las observaciones realizadas usando el ensayo de escisión de ARNt de levadura.

8. Ensayo de proliferación XTT

Los ensayos XTT se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente (Schiffer, S., et al., Antibodies, 2013. 2(1): p. 9-18). Antes de cada ensayo, las células HL-60 se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/ml y se estimularon con 300 U/ml de hIFN γ durante 24 h para regular al alza la expresión de CD64 (Bovolenta, C., et al., J Immunol, 1998. 160(2): p. 911-9). También realizamos ensayos XTT usando 5×10^5 M Φ humanos por ml como se ha descrito anteriormente. Los datos sin procesar se ajustaron usando el software GraphPad Prism v5.

Se llevaron a cabo ensayos de viabilidad para determinar la citotoxicidad específica *in vitro* de las variantes de H22-Ang cuando se incubaron con HL-60 estimuladas con hIFN γ y M Φ humanos (Figura 4). Cada hCFP también se ensayó frente a células L-540cy CD64- como control negativo para descartar la citotoxicidad inespecífica.

La proteína de fusión de tipo salvaje produjo un valor de CI50 de $10 \pm 2,7$ nM frente a las células HL-60 estimuladas con hIFN γ , pero el intercambio Q117G mejoró el valor de CI50 a $6,7 \pm 2,3$ nM. Sin embargo, se logró un aumento aún mayor en la citotoxicidad por el intercambio G85R/G86R, con el valor de CI50 cayendo hasta $0,57 \pm 0,14$ nM para H22-Ang GGRR_{mut}. La combinación de ambos conjuntos de intercambios en Ang GGRR/QG_{mut} produjo un valor de CI50 de $4,3 \pm 1,7$ nM. Cuando las proteínas de fusión se incubaron con M Φ humanos activados, Los valores promedio de CI50 fueron significativamente más bajos: 287 ± 39 pM para H22-Ang WT, 153 ± 42 pM para la variante QG, $43 \pm 5,6$ pM para GGRR_{mut} y 75 ± 2 pM para el mutante combinado. Ninguna de las hCFP demostró un efecto citotóxico frente a las células L-540cy (datos no mostrados).

9. Ensayos de apoptosis

Suspendimos 5×10^4 células HL-60 estimuladas con hIFN γ por ml (300 U/ml) en medio R10 y se sembraron en placas de 24 pocillos. Después de 24 h, se aplicó H22-Ang GGRR_{mut} 100 nM en un volumen final de 500 μ l por pocillo y las células se incubaron durante 72 h más a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células de control negativo se trataron con 30 μ l de PBS (100 % de viabilidad) mientras que las células de control positivo se trataron con 30 μ l de Zeocina (0 % de viabilidad). Las células se rasparon y se lavaron con tampón de unión de anexina V 1 x que contenía HEPES 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl₂ 2,5 mM (pH 7,4) seguido por centrifugación (1.500 rpm, 7 min, 4 °C). El sedimento se resuspendió en 450 μ l de medio R10 que contenía la proteína de fusión anexina V-eGFP y 50 μ l de tampón de unión anexina V 10 x (Stöcker, M., et al., Protein Expr Purif, 2008. 58(2): p. 325-331). Después de incubación durante 10 min en la oscuridad y una etapa de lavado, las células se resuspendieron en tampón de unión de anexina V 1 x suplementado con 1 μ g/ml de yoduro de propidio. La inducción de la apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo en los canales FL-1 y FL-3, contando 104 células (Verhoven, B., et al., J Exp Med, 1995. 182(5): p. 1597-601). Las células L-540cy (Kapp, U., et al., Ann Oncol, 1994. 5 Supl. 1: p. 121-6) se usaron como línea celular de control negativo y se trataron como se ha descrito anteriormente.

Las células apoptóticas se detectaron mediante tinción con anexina V/PI para obtener una mayor comprensión del efecto citotóxico de las CFP basadas en Ang. Usamos H22-Ang GGRR_{mut} como una proteína de fusión representativa e incubamos células HL-60 estimuladas con hIFN γ con 100 nM de la proteína durante 72 h, usando células L-540cy como control negativo en las mismas condiciones. La incubación de las células con anexina V-eGFP recombinante permitió que el marcador se uniera a las moléculas de fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas tempranas. Las células apoptóticas tardías se visualizaron mediante tinción simultánea con yoduro de propidio. Los datos fueron adquiridos por citometría de flujo, representando el canal de fluorescencia FL-1 frente a FL-3 (Tabla 2). Se determinaron las proporciones de células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas y se calcularon las diferencias entre las células tratadas con PBS y la hCFP. La exposición a la hCFP aumentó la proporción de células HL-60 apoptóticas tempranas en un 13,6 %, y la proporción de células HL-60 apoptóticas tardías en un 24,7 %. No hubo tales aumentos en las células L-540cy, y el número de células necróticas no cambió en ambas líneas celulares.

Tabla 2: Efecto citotóxico de H22-Ang GGRR_{mut} en células HL-60 y L-540cy

línea celular	apoptótica temprana	apoptótica tardía	necrótica
HL-60	+ 13,6%	+ 24,7%	+ 0,2%
L-540cy	-0,7%	-0,7%	+ 0,7%

10. Perfiles de expresión de RNH1 por PCR en tiempo real

El ARN se aisló de las células usando el kit NucleoSpin® RNA II (Macherey y Nagel, Düren, Alemania) y el ADNc se sintetizó usando el kit del sistema de síntesis de ADNc SuperScript™ III CellsDirect (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El ensayo de cebador Hs_RNH1_2_SG QuantiTect (Qiagen, Hilden, Alemania) se obtuvo de Source BioScience (Cambridge, Reino Unido, I.M.A.G.E.) y se usó un clon de ADNc de longitud completa IRAUp969G0610D como control positivo. La gluceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se amplificó para la normalización usando los cebadores GAPDH_dir (5'-GGT ATC GTG GAA GGA CTC ATG AC-3') y GAPDH_inv (5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG-3') amablemente proporcionados por PharmArtis GmbH (Aachen, Alemania). El kit de PCR QuantiFast SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemania) se usó según las instrucciones del fabricante en un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® 7500 (Life Technologies, Darmstadt, Alemania) con los siguientes ajustes: 10 min para la primera desnaturalización a 95 °C, 40 ciclos de desnaturalización de 15 s a 95 °C e hibridación/elongación durante 1 min a 60 °C, análisis de la curva de fusión con 1 min a 20 °C seguido de 1 min a 60 °C con una pendiente del 100 % y 1 min a 95 °C con una pendiente del 0,5 %. La cuantificación relativa se logró utilizando la ecuación $NA/NB = 2^{-\Delta CT}$.

Se usaron las células HL-60 y MΦ humanos activados para la extracción de ARN total, y los ARNm de RNH1 y GAPDH se amplificaron usando cebadores específicos de gen. Se añadió SYBR Green como reactivo de detección para monitorizar el proceso de amplificación y permitir la comparación cuantitativa de los niveles de ARNm de RNH1 en las diferentes células, usando GAPDH como gen de mantenimiento para la normalización. El análisis de la curva de fusión se realizó después para verificar la amplificación de fragmentos específicos. Los valores de CT observados para GAPDH y RNH1 se usaron para la cuantificación relativa (Tabla 3). En las células HL-60, el nivel de expresión del gen de RNH1 fue del 22,5 % en relación con GAPDH, pero esto cayó al 11,9 % en hMΦ activados. El análisis de la curva de fusión realizado después de 40 ciclos de amplificación confirmó la ausencia de fragmentos inespecíficos en las muestras ensayadas (datos no mostrados).

Tabla 3: Perfiles de expresión de *RNH1* en células HL-60 y hMΦ activados

células	% de RNH1 respecto a GAPDH
HL-60	22,5 %
hMΦ	11,9 %

11. Detección de RNH1 en lisados de células diana

Lisamos 8×10^6 células durante 1 h en tampón PBS 1 x que contenía Tritón X-100 al 1 % e inhibidor de proteasa (Tableta de Inhibidores de Proteasas Pierce, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Alemania) seguido de sonicación en hielo (Bandelin Sonoplus sonotrodo MS72, tres ciclos de 15 s a 50 W con interrupciones de enfriamiento de 15 s). Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (16.000 g, 4 °C, 10 min) y el contenido de proteína se determinó por absorbancia a 280 nm. Después, se separaron cantidades iguales de proteína mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12 % durante 60 min a 160 V. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (Carl Roth) (280 mA, 70 min, 4 °C) que después se bloqueó usando disolución de bloqueo Roti® (Carl Roth) durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-RNH1 de ratón F-5 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania) y la señal se detectó con un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), cada uno durante 60 min con lavados intermedios en PBS suplementado con Tween-20 al 0,05 %. Se añadió Sustrato de Transferencia Western Pierce ECL (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Alemania) según las instrucciones del fabricante y las bandas de proteínas se visualizaron usando un Stella Reader (Raytest GmbH). El lavado posterior se llevó a cabo de forma astringente usando PBS 1 x suplementado con Tween-20 al 0,05 %. Para verificar la igualdad en la carga, se añadió anti-β-actina de ratón marcado con peroxidasa (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) a la membrana durante 30 min y se detectó con sustrato de peroxidasa DAB SIGMAFAST™ (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante para visualizar adicionalmente β-actina a 42 kDa. Las imágenes se evaluaron usando Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe Systems GmbH, Munich, Alemania) para superponer las imágenes, y mediante densitometría 2D (paquete de software AIDA bio, Raytest GmbH). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism v5. Los datos se expresaron como la media ± desviación estándar (SD) como se indica. Las comparaciones estadísticas se realizaron usando un ensayo de la t de Student de dos colas sin emparejar. *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001.

Las células HL-60 estimuladas, así como los hMΦ activados, se lisaron y los lisados se fraccionaron mediante SDS-PAGE. Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se visualizó RNH1 específicamente usando un anticuerpo anti-RNH1 seguido de cuantificación de la señal usando una detección quimioluminiscente. Se aseguró la igualdad de carga en cada carril del gel comparando la señal generada por la proteína de mantenimiento β-actina (Figura 5). Sobre la base del patrón de bandas producido, se puede detectar una cantidad significativamente mayor de RNH1 en el lisado de células HL-60 en comparación con el de hMΦ activados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CURIT Biotech Holding GmbH

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN CITOLÍTICAS HUMANAS

<130> CUR-PA01-PCT

<150> US 62/011.921

<151> 13-06-2014

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 753 370 T3

Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ala
1 5 10 15

Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys Glu Ser Ile Met Arg Arg
20 25 30

Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile Asn Thr Phe Ile His Gly
35 40 45

Asn Lys Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu Asn Lys Asn Gly Asn Pro
50 55 60

His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser Ser Phe Gln Val Thr Thr
65 70 75 80

Cys Lys Leu His Gly Gly Ser Pro Trp Pro Pro Cys Gln Tyr Arg Ala
85 90 95

Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala Cys Glu Asn Gly Leu Pro
100 105 110

Val His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg Pro
115 120

<210> 2

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Proteína de fusión H22-Ang WT

<400> 2

ES 2 753 370 T3

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

ES 2 753 370 T3

Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
245 250 255

Ala Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu
260 265 270

Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys
275 280 285

Glu Ser Ile Met Arg Arg Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile
290 295 300

Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu
305 310 315 320

Asn Lys Asn Gly Asn Pro His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser
325 330 335

Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys Lys Leu His Gly Gly Ser Pro Trp Pro
340 345 350

Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala
355 360 365

Cys Glu Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg
370 375 380

Pro Ala Glu His Glu Phe Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
405 410 415

<210> 3

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión H22-Ang GGRR_{mut}

10

<400> 3

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

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser
20 25 30

ES 2 753 370 T3

Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Asn Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
 35 40 45
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser
 50 55 60
 Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro
 85 90 95
 Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Arg Tyr Glu
 100 105 110
 Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 130 135 140
 Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser
 165 170 175
 Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 180 185 190
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
 195 200 205
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 210 215 220
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 245 250 255
 Ala Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu
 260 265 270
 Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys
 275 280 285

ES 2 753 370 T3

Glu Ser Ile Met Arg Arg Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile
290 295 300

Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu
305 310 315 320

Asn Lys Asn Gly Asn Pro His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser
325 330 335

Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys Lys Leu His Arg Arg Ser Pro Trp Pro
340 345 350

Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala
355 360 365

Cys Glu Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg
370 375 380

Pro Ala Glu His Glu Phe Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
405 410 415

<210> 4

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión H22-Ang QG_{mut}

10

<400> 4

ES 2 753 370 T3

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

Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ser
20 25 30

Ser Gly Phe Ile Phe Ser Asp Asn Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala
35 40 45

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser
50 55 60

Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

ES 2 753 370 T3

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

ES 2 753 370 T3

Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys Lys Leu His Gly Gly Ser Pro Trp Pro
340 345 350

Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala
355 360 365

Cys Glu Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gly Ser Ile Phe Arg Arg
370 375 380

Pro Ala Glu His Glu Phe Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
405 410 415

<210> 5

<211> 415

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión H22-Ang GGRR/QG_{mut}

10

<400> 5

ES 2 753 370 T3

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

ES 2 753 370 T3

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
 130 135 140
 Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
 145 150 155 160
 Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser
 165 170 175
 Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 180 185 190
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
 195 200 205
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 210 215 220
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala
 245 250 255
 Ala Ala Leu Glu Ser Arg Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu
 260 265 270
 Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys
 275 280 285
 Glu Ser Ile Met Arg Arg Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile
 290 295 300
 Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys Ala Ile Cys Glu
 305 310 315 320
 Asn Lys Asn Gly Asn Pro His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser
 325 330 335
 Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys Lys Leu His Arg Arg Ser Pro Trp Pro
 340 345 350
 Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala
 355 360 365
 Cys Glu Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gly Ser Ile Phe Arg Arg
 370 375 380

ES 2 753 370 T3

Pro Ala Glu His Glu Phe Arg Gly Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
385 390 395 400

Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
405 410 415

5 <210> 6
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador
<400> 6
ccacttgcaa gctacatcgg cgctcccctt ggctccatg cc 42

15 <210> 7
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador
<400> 7
ggcatggagg ccagggggag cgccgatgta gcttgcaagt gg 42

25 <210> 8
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador
<400> 8
cctgtccact tggatggatc aatttccgt cg 32

35 <210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Cebador
<400> 9
cgacggaaaa ttgatccatc caagtggaca gg 32

45 <220>
<223> Cebador
<400> 9
cgacggaaaa ttgatccatc caagtggaca gg 32

50

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión citolítica humana (hCFP) recombinante adecuada para inducir apoptosis en células diana humanas que comprende un componente de unión específico de célula diana y un dominio efector humano, en donde el componente de unión comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo con un sitio de unión a antígeno para la unión al receptor de superficie celular CD64, y el dominio efector comprende una variante de angiogenina (Ang) humana de tipo salvaje como se muestra en SEQ ID NO: 1, en donde la variante de la angiogenina humana de tipo salvaje como se muestra en SEQ ID NO: 1 contiene al menos sustituciones en las posiciones que corresponden estructuralmente o por homología de secuencia de aminoácidos a las posiciones 85, 86 y 117, y en donde las sustituciones son G85R, G86R y Q117G, y en donde la secuencia de aminoácidos de dicha variante es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
2. La proteína de fusión citolítica humana recombinante según la reivindicación 1, en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, scFv, dominio único, bis scFv, Fab2, Fab3, minicuerpo, diacuerpo, triplecuerpo, tetracuerpo y tandab.
3. La proteína de fusión citolítica humana recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el componente de unión es un fragmento variable de cadena única (scFv) específico de CD64.
4. La proteína de fusión citolítica humana recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el componente de unión es el fragmento variable de cadena única H22 (scFv) específico de CD64.
5. La proteína de fusión citolítica humana recombinante según la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión citolítica humana (hCFP) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una hCFP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que se transforma con el vector de la reivindicación 7 o que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6.
9. La célula huésped según la reivindicación 8, en donde la célula huésped es una célula HEK293T.
10. Un método para preparar la proteína de fusión citolítica humana recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el método comprende cultivar la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 y aislar la proteína de fusión del cultivo celular.
11. Una proteína de fusión citolítica humana recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para el uso en el tratamiento de enfermedades malignas, o enfermedades inflamatorias crónicas, tales como leucemia mieloide aguda, artritis, EPOC incluyendo enfisema, asma intrínseco y extrínseco; enfermedad cutánea incluyendo dermatitis atópica, erupción polimorfa lumínica, LES; enfermedades autoinmunes, incluyendo injerto contra huésped, esclerosis múltiple, síndrome de activación de macrófagos, artritis reumatoide, artritis juvenil; enfermedades intestinales incluyendo la enfermedad de Crohn y la enfermedad intestinal crónica.
12. La proteína de fusión citolítica humana recombinante según la reivindicación 11 para el uso en el tratamiento de leucemia mieloide y/o enfermedades inflamatorias crónicas.
13. Un fármaco que comprende la proteína de fusión citolítica humana recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en combinación con un vehículo farmacológicamente aceptable.

FIGURA 1

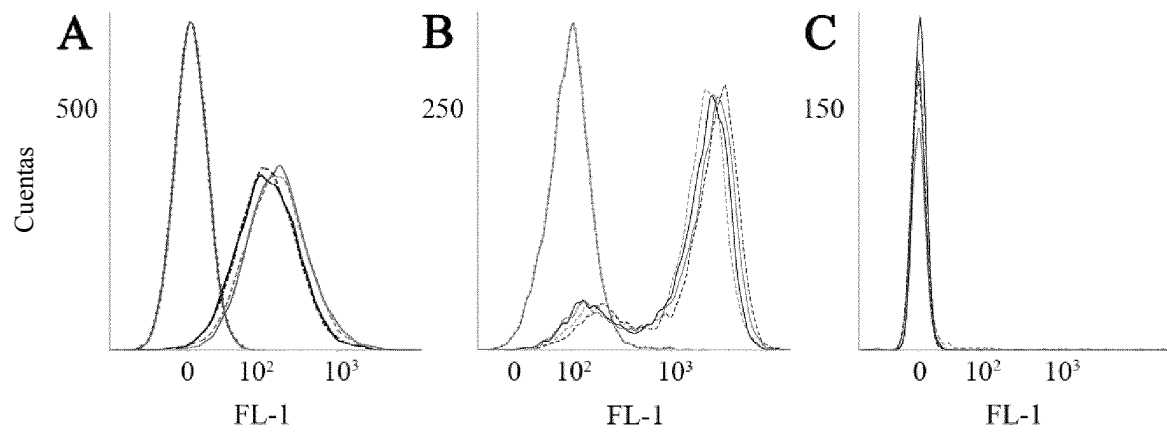


FIGURA 2

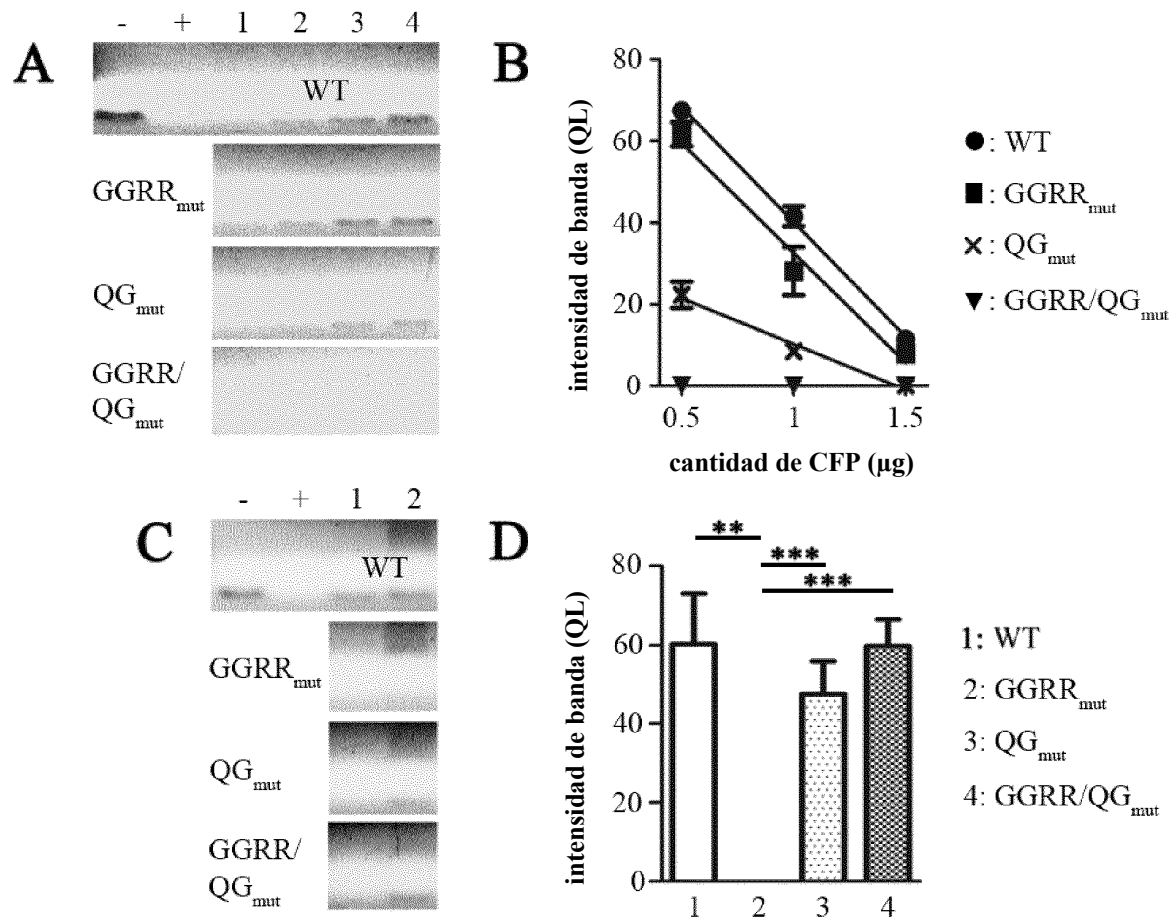


FIGURA 3

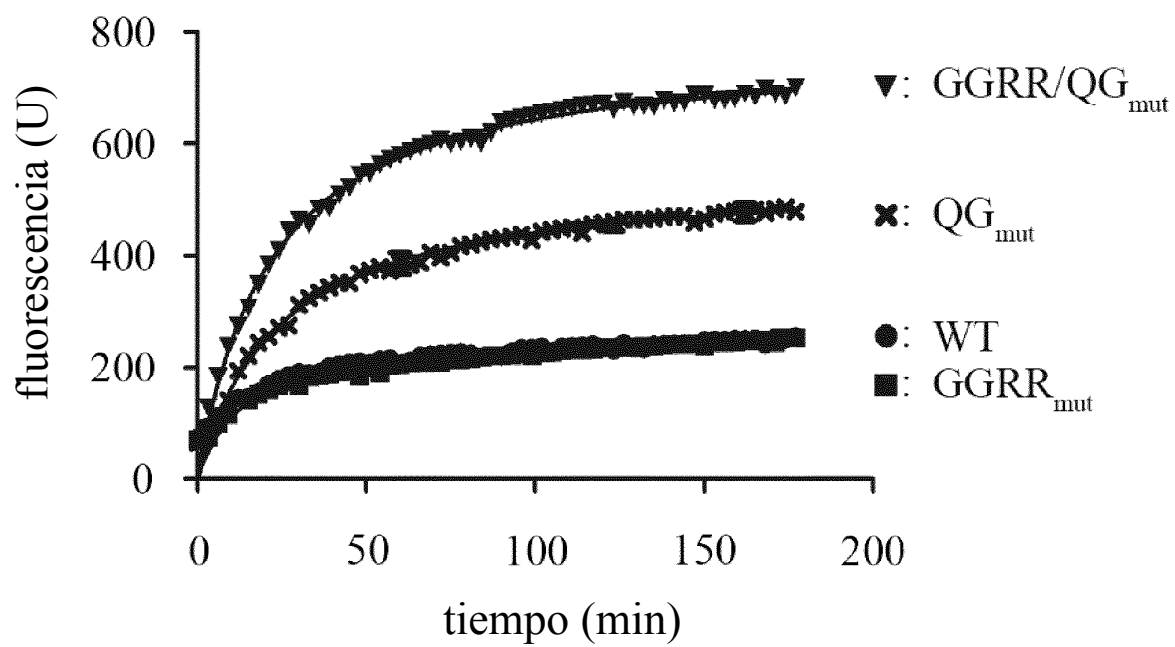


FIGURA 4

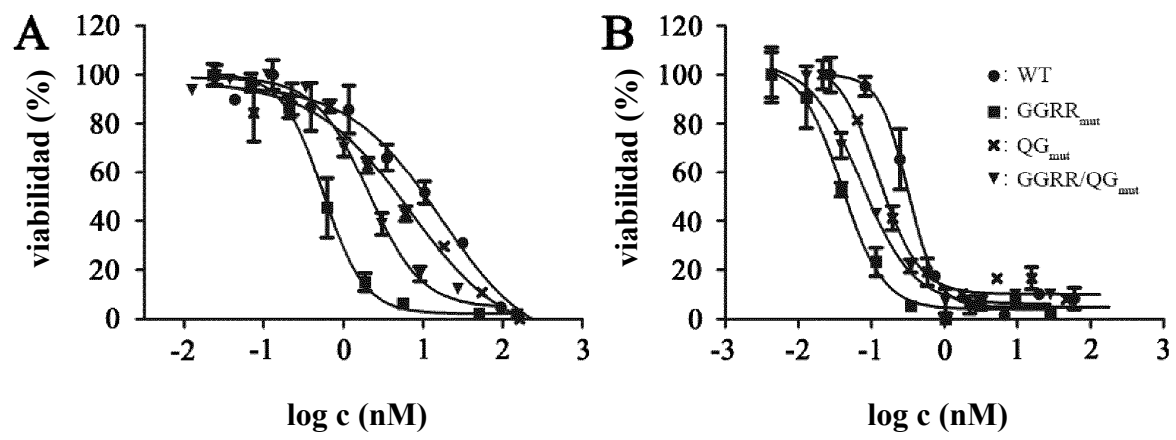


FIGURA 5

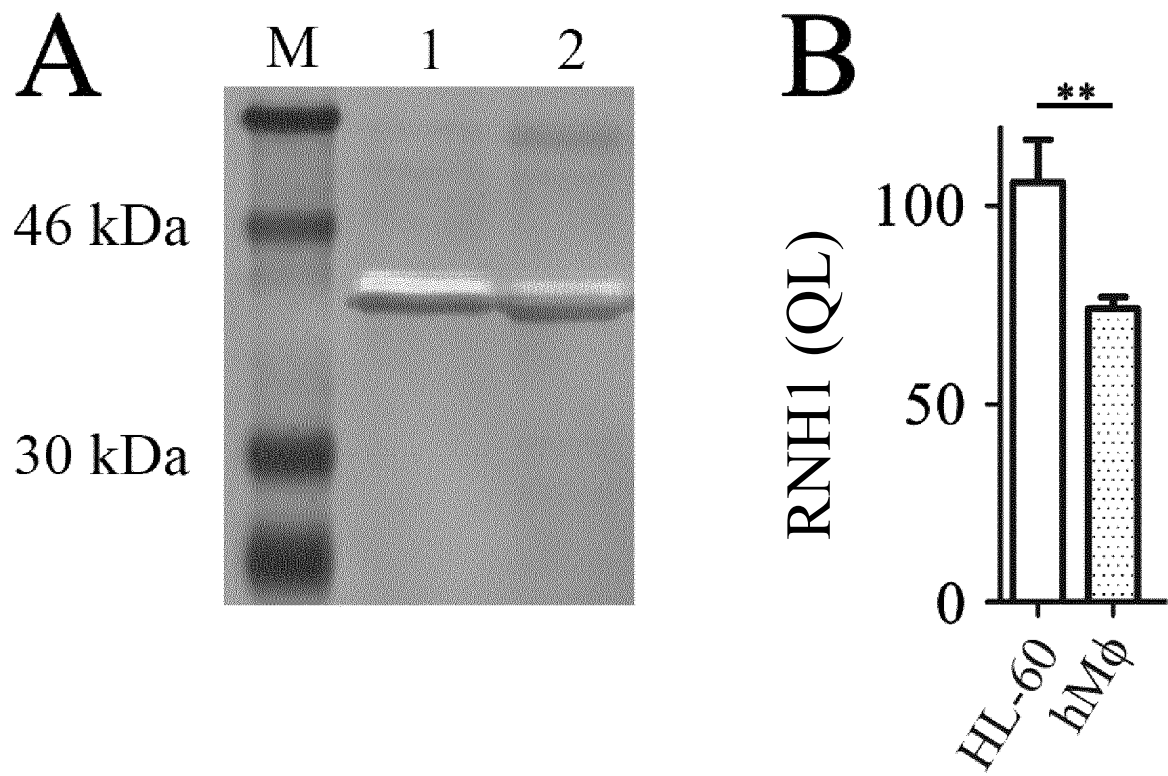


FIGURA 6

Secuencia de aminoácidos de angiogenina humana de tipo salvaje sin secuencia líder (SEQ ID NO.1)

1	QDNSRYTHFL TQHYDAKPQG RDDRYCESIM RRRGLTSPCK DINTFIHGNC RSIKALCENK
61	NGNPHRENLR ISKSSFQVTT CKLHGGSPWP PCQYRATAGF RNVVVACENG LPVHLDQSIF
121	RRP

FIGURA 7

Secuencia de H22-Ang WT (SEQ ID N0.2)

1 DAAQPAMAQV QLVESSGGGVV QPGRSLRLSC SSSGFIFSDN YMYWVRQAPG KGLEWVATIS
 61 DGGSYTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLFLQ MDLRPEDTG VYFCARGYYR YEGAMDYWGQ
 121 GTPVTVSSGG GSGGGGGSGG GGSDIQLTQS PSSLSASVGD RVTITCKSSQ SVLYSSNQKN
 181 YLAWYQQKPG KAPKLLIYWA STRESGVPSR FSGSGSGTDF TFTISSLOPE DIATYYCHQY
 241 LSSWTFGQGT KLEIKAAALE SRQDNSRYTH FLTQHYDAKP QGRDDRYCES IMRRRGLTSP 301
CKDINTFIHG NKRSIKAICE NKNGNPHREN LRISKSSFQV TTCKLHGGSP WPPCQYRATA
 361 GFRNVVVACE NGLPVHLDQS IFRRPAEHEF RGGPEQKLIS EEDLNSAVDH HHHHH

Secuencia de H22-Ang GRR_{mut} (SEQ ID N0.3)

1 DAAQPAMAQV QLVESSGGGVV QPGRSLRLSC SSSGFIFSDN YMYWVRQAPG KGLEWVATIS
 61 DGGSYTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLFLQ MDLRPEDTG VYFCARGYYR YEGAMDYWGQ
 121 GTPVTVSSGG GSGGGGGSGG GGSDIQLTQS PSSLSASVGD RVTITCKSSQ SVLYSSNQKN
 181 YLAWYQQKPG KAPKLLIYWA STRESGVPSR FSGSGSGTDF TFTISSLOPE DIATYYCHQY
 241 LSSWTFGQGT KLEIKAAALE SRQDNSRYTH FLTQHYDAKP QGRDDRYCES IMRRRGLTSP 301
CKDINTFIHG NKRSIKAICE NKNGNPHREN LRISKSSFQV TTCKLHRRSP WPPCQYRATA
 361 GFRNVVVACE NGLPVHLDQS IFRRPAEHEF RGGPEQKLIS EEDLNSAVDH HHHHH

Secuencia de H22-Ang QG_{mut} (SEQ ID N0.4)

1 DAAQPAMAQV QLVESSGGGVV QPGRSLRLSC SSSGFIFSDN YMYWVRQAPG KGLEWVATIS
 61 DGGSYTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLFLQ MDLRPEDTG VYFCARGYYR YEGAMDYWGQ
 121 GTPVTVSSGG GSGGGGGSGG GGSDIQLTQS PSSLSASVGD RVTITCKSSQ SVLYSSNQKN
 181 YLAWYQQKPG KAPKLLIYWA STRESGVPSR FSGSGSGTDF TFTISSLOPE DIATYYCHQY
 241 LSSWTFGQGT KLEIKAAALE SRQDNSRYTH FLTQHYDAKP QGRDDRYCES IMRRRGLTSP 301
CKDINTFIHG NKRSIKAICE NKNGNPHREN LRISKSSFQV TTCKLHGGSP WPPCQYRATA
 361 GFRNVVVACE NGLPVHLDGS IFRRPAEHEF RGGPEQKLIS EEDLNSAVDH HHHHH

Secuencia de H22-Ang GRR/QG_{mut} (SEQ ID N0.5)

1 DAAQPAMAQV QLVESSGGGVV QPGRSLRLSC SSSGFIFSDN YMYWVRQAPG KGLEWVATIS
 61 DGGSYTYYPD SVKGRFTISR DNSKNTLFLQ MDLRPEDTG VYFCARGYYR YEGAMDYWGQ
 121 GTPVTVSSGG GSGGGGGSGG GGSDIQLTQS PSSLSASVGD RVTITCKSSQ SVLYSSNQKN
 181 YLAWYQQKPG KAPKLLIYWA STRESGVPSR FSGSGSGTDF TFTISSLOPE DIATYYCHQY

ES 2 753 370 T3

241 LSSWTFGQGT KLEIKAAALE SRQDNSRYTH FLTQHYDAKP QGRDDRYCES IMRRRGLTSP 301
CKDINTFIHG NKRSIKAICE NKNGNPHREN LRISKSSFQV TTCKLHRRSP WPPCQYRATA
361 GFRNVVACE NGLPVHLDGS IFRRPAEHEF RGGPEQKLIS EEDLNSAVDH HHHHH