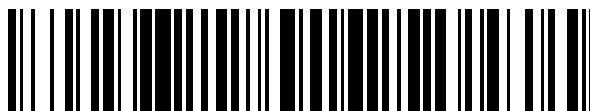


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 174**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2014** **PCT/US2014/040324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014** **WO14194247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014** **E 14732800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020** **EP 3004162**

54 Título: **Anticuerpos antiteicoicos de pared y conjugados**

30 Prioridad:

31.05.2013 US 201361829461 P
31.05.2013 US 201361829466 P
22.05.2014 US 201414284609
22.05.2014 WO PCT/US2014/039113

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.11.2020

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080 , US

72 Inventor/es:

BROWN, ERIC;
DARWISH, MARTINE;
FLYGARE, JOHN;
HAZENBOS, WOUTER;
LEE, BYOUNG-CHUL;
LEHAR, SOPHIE, M.;
MARIATHASAN, SANJEEV;
MORISAKI, JOHN, HIROSHI;
PILLOW, THOMAS, H.;
STABEN, LEANNA;
VANDLEN, RICHARD;
KOEFOED, KLAUS;
STRANDH, MAGNUS y
ANDERSEN, PETER, S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 793 174 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

Anticuerpos antiteicoicos de pared y conjugados

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica los derechos de prioridad respecto a la solicitud de EE.UU. n.º de serie 14/284.609, presentada el 22 de mayo de 2014, que es una solicitud no provisional presentada bajo 37 CFR §1.53 (b), reclama el derecho bajo 35 USC §119 (e) de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º de Serie 61/829.461 presentada el 31 de mayo de 2013,

PRESENTACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS EN EL ARCHIVO DE TEXTO ASCII

El contenido de la siguiente presentación en el archivo de texto ASCII se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad: un formulario legible por ordenador (CRF, por sus siglas en inglés) del Listado de secuencias (nombre de archivo: P4960R2WO_PCTSequenceListing.txt, fecha de registro: 30 de mayo de 2014, tamaño: 195.240 bytes).

Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos anti-ácidos teicoicos de pared ("anti-WTA", por sus siglas en inglés) conjugados con antibióticos de tipo rifamicina y al uso de los conjugados anticuerpo-antibiótico resultantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Antecedentes de la invención

Las bacterias patógenas son una causa importante de enfermedad y muerte tanto en seres humanos como en animales. Entre ellas destaca *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; SA), que es la principal causa de infecciones bacterianas en seres humanos en todo el mundo. *S. aureus* puede causar varias enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta enfermedades potencialmente mortales tales como la neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico (TSS, por sus siglas en inglés), bacteriemia y sepsis. Su incidencia varía desde infecciones de la piel, de tejidos blandos, respiratorias, de huesos, de articulaciones, endovasculares hasta de heridas. Todavía es una de las cinco causas más comunes de infecciones nosocomiales y, con frecuencia, es la causa de infecciones de heridas posquirúrgicas. Cada año, unos 500.000 pacientes en hospitales estadounidenses contraen una infección por estafilococos.

En las últimas décadas, la infección por *S. aureus* se está volviendo cada vez más difícil de tratar en gran medida debido a la aparición de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA, por sus siglas en inglés) que es resistente a todos los antibióticos betalactámicos conocidos (Boucher, HW et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 48, 1-12 (2009)). Las circunstancias son tan graves, que en 2005, se indicó que la infección con MRSA era la principal causa de muerte debido a un solo agente infeccioso, responsable de más de 15.000 muertes en los Estados Unidos (DeLeo, F.R. & Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. The Journal of Clinical Investigation 119:2464-2474 (2009)). La Vancomicina, linezolid y daptomicina se han convertido en los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones invasivas por MRSA (Boucher, H., Miller, L.G. & Razonable, R.R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 51 Suppl 2, S183-197 (2010)). Sin embargo, también se ha informado una susceptibilidad reducida a la vancomicina y resistencia cruzada a linezolid y daptomicina en cepas clínicas de MRSA (Nannini, E., Murray, B.E. & Arias, C.A. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Current opinion in pharmacology 10, 516-521 (2010)). A lo largo del tiempo, la dosis de vancomicina necesaria para superar la resistencia se ha elevado a niveles en los que se produce nefrotoxicidad. Por lo tanto, la mortalidad y morbilidad por infecciones invasivas por MRSA siguen siendo altas a pesar de estos antibióticos.

Aunque generalmente se cree que SA es un patógeno extracelular, las investigaciones que se remontan al menos 50 años han revelado su capacidad de infectar y sobrevivir en diferentes tipos de células hospedadoras, tanto en fagocitos profesionales como en células no fagocíticas (Gresham, H.D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J Immunol 164, 3713-3722 (2000); Anwar, S., Prince, L.R., Foster, S.J., Whyte, M.K. & Sabroe, I. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. Clinical and Experimental Immunology 157, 216-224 (2009); Fraunholz, M. & Sinha, B. Intracellular *staphylococcus aureus*: Live-in and let die. Frontiers in cellular and infection microbiology 2, 43 (2012); Garzoni, C. & Kelley, W.L. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. EMBO molecular medicine 3:115-117 (2011)). Esta persistencia intracelular facultativa permite la evasión inmunitaria del hospedador, la colonización a largo plazo del hospedador, el mantenimiento de un estado infectado de forma crónica y es probablemente una causa de los fracasos clínicos de la terapia antibiótica convencional y de las recaídas

posteriores. Además, la exposición de bacterias intracelulares a concentraciones de antibióticos subóptimas puede favorecer la aparición de cepas resistentes a antibióticos, haciendo así, que este problema clínico sea más grave. De acuerdo con estas observaciones, el tratamiento de pacientes con infecciones invasivas por MRSA, tales como bacteriemia o endocarditis con vancomicina o daptomicina, se asoció con tasas de fracaso superiores al 50 % (Kullar, R., Davis, S.L., Levine, D.P. & Rybak, M.J. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52, 975-981 (2011); Fowler, V.G., Jr. et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *The New England journal of medicine* 355, 653-665 (2006); Yoon, Y.K., Kim, J.Y., Park, D.W., Sohn, J.W. & Kim, M.J. Predictors of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in patients treated with vancomycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:1015-1018 (2010)). Por lo tanto, una terapia antiestafilocócica más exitosa debe incluir la eliminación de las bacterias intracelulares.

La mayoría de los agentes antibacterianos de hoy en día, químicamente, son modificaciones semisintéticas de diferentes compuestos naturales. Estos incluyen, por ejemplo, los agentes antibacterianos betalactámicos, que incluyen las penicilinas (producidas por hongos en el género *Penicillium*), las cefalosporinas y los carbapenémicos. Los compuestos antimicrobianos que todavía están aislados de organismos vivos incluyen los aminoglucósidos, mientras que otros agentes antibacterianos, por ejemplo, las sulfonamidas, las quinolonas y las oxazolidinonas, están producidos únicamente por síntesis química. De acuerdo con esto, muchos compuestos antibacterianos se clasifican en función del origen químico/biosintético en natural, semisintético y sintético. Otro sistema de clasificación se basa en la actividad biológica; en esta clasificación, los agentes antibacterianos se dividen en dos grandes grupos de acuerdo con su efecto biológico sobre los microorganismos: los agentes bactericidas destruyen bacterias y los agentes bacteriostáticos ralentizan o detienen el crecimiento bacteriano.

Las ansamicinas son una clase de antibióticos, incluyendo rifamicina, rifampina, rifampicina, rifabutina, rifapentina, rifalazil, ABI-1657 y análogos de los mismos, que inhiben la ARN polimerasa bacteriana y tienen una potencia excepcional contra bacterias grampositivas y gramnegativas selectivas (Rothstein, D.M., et al (2003) *Expert Opin. Invest. Drugs* 12(2):255-271; documentos US 7342011; US 7271165).

Se han informado inmunoterapias para prevenir y tratar infecciones por *S. aureus* (incluyendo MRSA). El documento US2011/0262477 se refiere a los usos de las proteínas de adhesión bacteriana Eap, Emp y AdsA como vacunas para estimular la respuesta inmunitaria contra MRSA. El documento WO2000071585 describe anticuerpos monoclonales aislados reactivos a aislados específicos de cepas de *S. aureus*. El documento US20110059085A1 sugiere una estrategia basada en Ac que utiliza Ac IgM específicos para uno o más antígenos capsulares de SA, aunque no se describieron anticuerpos reales.

Los ácidos teicoicos (TA, por sus siglas en inglés) son polisacáridos bacterianos que se encuentran dentro de la pared celular de las bacterias Gram positivas, incluyendo SA. Los ácidos teicoicos de pared (WTA, por sus siglas en inglés) son aquellos enlazados covalentemente a la capa de peptidoglicano (PDG) de la pared celular; mientras que los ácidos lipoteicoicos (LTA, por sus siglas en inglés) son aquellos enlazados covalentemente a los lípidos de la membrana citoplasmática. Xia et al. (2010) *Intl. J. Med. Microbiol.* 300:148-54. Estos glicopolímeros desempeñan papeles cruciales en la supervivencia bacteriana en condiciones desfavorables y en otros procesos celulares básicos. Las estructuras de WTA conocidas varían ampliamente entre especies bacterianas. Los TA de *S. aureus* están compuestos por subunidades repetitivas de poliol fosfato tales como ribitol fosfato o glicerol fosfato. Dada su diversidad y variabilidad estructural, los WTA se consideran dianas atractivas para anticuerpos y como vacunas, *ibid*.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), también conocidos como inmunoconjugados, son moléculas quimioterapéuticas dirigidas que combinan las propiedades ideales tanto de los anticuerpos como de los fármacos citotóxicos dirigiendo los potentes fármacos citotóxicos a células tumorales que expresan antígenos (Teicher, B.A. (2009) *Curr. Cancer Drug Targets* 9:982-1004), potenciando, de este modo, el índice terapéutico al maximizar la eficacia y minimizar la toxicidad inespecífica (Carter, PJ y Senter P.D. (2008) *The Cancer J.* 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107. El ADC comprende un anticuerpo dirigido fijado covalentemente a través de una unidad enlazadora a un resto de fármaco citotóxico. Los inmunoconjugados permiten el suministro dirigido de un resto de fármaco a un tumor y la acumulación intracelular en el mismo, donde la administración sistémica de fármacos no conjugados puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Polakis P. (2005) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:382-387). El desarrollo eficaz de ADC para un antígeno diana determinado depende de la optimización de parámetros tales como los niveles de expresión del antígeno diana, la accesibilidad tumoral (Kovtun, Y.V. and Goldmacher V.S. (2007) *Cancer Lett.* 255:232-240), la selección de anticuerpos (documento US 7964566), la estabilidad del enlazador (Erickson et al (2006) *Cancer Res.* 66(8):4426-4433; Doronina et al (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765), el mecanismo de acción y potencia de los fármacos citotóxicos, la carga de fármacos (Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070) y el modo de conjugación enlazador-fármaco con el anticuerpo (Lyon, R. et al (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138; Xie et al (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu et al (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patentes* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer*

Cell 3:207-212; Trail et al (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Res. 19:605-614).

El concepto de ADC en la terapia contra el cáncer también se ha ampliado a la terapia antibacteriana, en este caso, la parte de fármaco es un antibiótico, dando como resultado conjugado anticuerpo-antibiótico (AAC, por sus siglas en inglés). Los documentos US 5545721 y US 6660267 describen la síntesis de un conjugado inmunoglobulina-antibiótico no específico que se une a la superficie de bacterias diana a través del antibiótico y los usos del mismo para tratar sepsis. El documento US 7569677 y patentes relacionadas sugieren anticuerpos proféticamente conjugados con antibióticos que tienen una parte de unión a antígeno específica para un antígeno bacteriano (tal como el polisacárido capsular de SA), pero carece de una región constante que reaccione con una proteína bacteriana de unión a Fc (por ejemplo, proteína A estafilocócica).

El documento WO 2004/050846 describe el uso de composiciones que comprenden anticuerpos anti-WTA para su uso como vacunas para tratar infecciones por estafilococos mediante la unión a *S. aureus* para bloquear la infección.

El documento US 6.322.788 describe anticuerpos capaces de unirse a un antígeno bacteriano que carece de la capacidad de unirse a proteínas bacterianas de unión a Fc.

El documento WO 2006/081711 describe conjugados anticuerpo-fármaco usando péptidos de auristatina, incluyendo MeVal-Val-Dil-Dap-Norefedrina (MMAE) y MeVal-Val-Dil-Dap-Phe (MMAF).

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Cualquier ejemplo de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones forma una realización de la invención.

La invención proporciona composiciones denominadas "conjugados anticuerpo-antibiótico" o "AAC", por sus siglas en inglés) que comprenden un anticuerpo conjugado por una unión covalente a uno o más restos antibióticos de tipo rifamicina como se establece en las reivindicaciones.

Los conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención pueden emplear un anticuerpo monoclonal anti-WTA, que comprende una cadena ligera y una cadena H, comprendiendo, la cadena L, CDR L1, CDR L2 y CDR L3 y comprendiendo la cadena H, CDR H1, CDR H2 y CDR H3, en donde la CDR L1, CDR L2, y CDR L3 y CDR H1, CDR H2 y CDR H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR de cada uno de los Ac 4461 (SEQ ID NO: 1-6), 4624 (SEQ ID NO: 7-12), 4399 (SEQ ID NO: 13-18) y 6267 (SEQ ID NO: 19-24) respectivamente, como se muestra en las Tablas 6A y 6B.

En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VH seleccionada de la secuencia de VH de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En un ejemplo, este anticuerpo comprende además una región variable de cadena L (VL) en donde la VL comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VL seleccionada de la secuencia de VL de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En otro ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una región variable de cadena L (VL) en donde la VL comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VL seleccionada de la secuencia de VL de SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En cualquiera de los ejemplos anteriores, la identidad de secuencia puede ser del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

En ejemplos más específicos, el anticuerpo comprende:

- (i) VL de SEQ ID NO: 25 y VH de SEQ ID NO: 26;
- (ii) VL de SEQ ID NO: 27 y VH de SEQ ID NO: 28;
- (iii) VL de SEQ ID NO: 29 y VH de SEQ ID NO: 30; o
- (iv) VL de SEQ ID NO: 31 y VH de SEQ ID NO: 32.

En algunos ejemplos, el anticuerpo monoclonal anti-WTA (ácido teicoico de pared) aislado comprende una cadena ligera (L) y una cadena pesada (H), en donde:

- (a) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSVLSRANNNYYVA (SEQ ID NO: 1), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTREF (SEQ ID NO: 2) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTSRRT (SEQ ID NO: 3); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de DYYMH (SEQ ID NO: 4), CDR H2 que comprende la secuencia de WINPKSGGTNYAQRFGQ (SEQ ID NO: 5) y CDR H3

que comprende la secuencia de DCGSGGLRDF (SEQ ID NO: 6);

(b) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de RSNQNLLSSNNNYLA (SEQ ID NO: 7), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRES (SEQ ID NO: 8) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYANPRT (SEQ ID NO: 9); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de DYYIH (SEQ ID NO: 10), CDR H2 que comprende la secuencia de WINPNTGGTYAQKFRD (SEQ ID NO: 11) y CDR H3 que comprende la secuencia de DCGRGGLRDI (SEQ ID NO: 12);

(c) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSNQNVLASSNDKNYLA (SEQ ID NO: 13), CDR L2 que comprende la secuencia de WASIRES (SEQ ID NO: 14) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTNPRT (SEQ ID NO: 15); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de DYYIH (SEQ ID NO: 16), CDR H2 que comprende la secuencia de WINPNTGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO: 17) y CDR H3 que comprende la secuencia de DCGNAGLRDI (SEQ ID NO: 18); o

(d) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQNVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 19), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRES (SEQ ID NO: 20) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYYTSPPYT (SEQ ID NO: 21); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de SYWIG (SEQ ID NO: 22), CDR H2 que comprende la secuencia de IHPGDSKTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 23) y CDR H3 que comprende la secuencia de LYCSGGSCYSDFSSLGAGGYYYGGMV (SEQ ID NO: 24).

En una cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo puede ser un fragmento de unión a antígeno que carece de una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un F(ab) o F(ab')₂. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera, en donde la región constante de cadena pesada y/o la región constante de cadena ligera comprenden uno o más aminoácidos que están sustituidos con restos de cisteína. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácidos A118C y/o S400C, y/o la región constante de cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos V205C, en donde la numeración está de acuerdo con la numeración EU. En algunos ejemplos, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y/o la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151. En algunos ejemplos, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. En algunos ejemplos, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

En un aspecto, el Ac de una cualquiera de las realizaciones anteriores se une a WTA alfa.

En otro aspecto, la invención emplea un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena H, comprendiendo, la cadena L, CDR L1, CDR L2 y CDR L3 y/o comprendiendo, la cadena H, CDR H1, CDR H2 y CDR H3, en donde la CDR L1, CDR L2, y CDR L3 y CDR H1, CDR H2 y CDR H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de cada uno de los Ac mostrados en la Figura 14 (SEQ ID NO: 33-110). En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado que comprende una cadena ligera y una cadena H, comprendiendo, la cadena L, CDR L1, CDR L2 y CDR L3 y/o comprendiendo, la cadena H, CDR H1, CDR H2 y CDR H3, en donde la CDR L1, CDR L2, y CDR L3 y CDR H1, CDR H2 y CDR H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR correspondientes de cada uno de los Ac mostrados en la Figura 15A, 15B, 16A y 16B (anticuerpos 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys y 4497.v8HCLC-Cys). En una realización específica, estos Ac se unen a WTA beta.

En otro aspecto, la invención emplea un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado, específicamente el anticuerpo monoclonal anti-WTA beta que comprende una región variable de cadena L (VL) en donde la VL comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VL seleccionada de la secuencia de VL correspondiente a cada uno de los anticuerpos 6078, 6263, 4450, 6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 y 4487 respectivamente, tal como se muestra en las Figuras 17A-1 a 17A-2 en las posiciones Kabat 1-107. En ejemplos adicionales, el anticuerpo además comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VH seleccionada de las secuencias de VH correspondientes a cada uno de los anticuerpos 6078, 6263, 4450, 6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 y 4487 respectivamente, tal como se muestra en las Figuras 17B-1 a 17B-2 en las posiciones Kabat 1-113. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la identidad de secuencia puede ser del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En un ejemplo más específico del anticuerpo, la VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 112 y la VL comprende la SEQ ID NO: 111.

En otro aspecto, la invención emplea un anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado, específicamente el anticuerpo monoclonal anti-WTA beta que comprende una región variable de cadena L (VL) en donde la VL comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la región VL seleccionada de la secuencia de VL correspondiente a cada uno de los anticuerpos como se muestra en las Figuras 15A o 16A (anticuerpos 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys y 4497.v8HCLC-Cys) en las posiciones Kabat 1-107. En ejemplos adicionales, el anticuerpo además comprende una región variable de cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo

de la región VH seleccionada de las secuencias de VH correspondientes a cada uno de los anticuerpos como se muestra en las Figuras 15B y 16B (anticuerpos 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys y 4497.v8HCLC-Cys) en las posiciones Kabat 1-113. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la identidad de secuencia puede ser del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En una realización adicional, este anticuerpo comprende además, una VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 119.

Las variantes de cadena H y L modificadas por ingeniería con Cys de anti-WTA beta pueden emparejarse en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ac completos para conjugarse con productos intermedios enlazador-Abx para generar los AAC anti-WTA de la invención. En una realización, la cadena L comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121 y la cadena H comprende la secuencia de SEQ ID NO: 124. En otra realización, el anticuerpo aislado comprende una cadena L de SEQ ID NO: 123 y una cadena H que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 124 o SEQ ID NO: 157. En una realización particular, el anticuerpo anti-WTA beta así como el AAC anti-WTA beta de la invención comprende una cadena L de SEQ ID NO: 123.

Otro ejemplo más es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cada uno de los Ac anti-WTA alfa de la Figura 13A y la Figura 13B. También se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cada uno de los Ac anti-WTA beta de la Figura 14, Figuras 15A y 15B, Figuras 16A y 16B, y Figuras 17A y 17B.

En una realización adicional, los anticuerpos anti-WTA beta y anti-WTA alfa de la presente invención son fragmentos de unión a antígeno que carecen de región Fc, preferentemente $F(ab')_2$ o $F(ab)$. Por lo tanto, la presente invención proporciona conjugados anticuerpo-antibiótico en donde el anticuerpo de WTA es un $F(ab')_2$ o $F(ab)$.

En otro aspecto, la invención emplea un anticuerpo monoclonal anti-WTA que se une a WTA beta.

En algunos ejemplos, el anticuerpo monoclonal anti-WTA (ácido teicoico de pared) aislado comprende una cadena ligera (L) y una cadena pesada (H), en donde:

(a) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO: 100) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103), y CDR H3 que comprende la secuencia de GDGGLDD (SEQ ID NO: 104); o

(b) la cadena L comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO: 100) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); y la cadena H comprende CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103), y CDR H3 que comprende la secuencia de GEGGLDD (SEQ ID NO: 118).

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la secuencia de VH SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 156. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la secuencia de VL SEQ ID NO: 119. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una región variable de cadena ligera (VL), en donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la secuencia de VL SEQ ID NO: 119. En cualquiera de las realizaciones anteriores, la identidad de secuencia puede ser del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH), en donde la VL comprende la secuencia de SEQ ID NO: 119 y la VH comprende la secuencia de SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 156.

En algunas realizaciones descritas anteriormente, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno que carece de una región Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un $F(ab)$ o $F(ab')_2$. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera, en donde la región constante de cadena pesada y/o la región constante de cadena ligera comprenden uno o más aminoácidos que están sustituidos con restos de cisteína. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la sustitución de aminoácidos A118C o S400C, y/o la región constante de cadena ligera comprende la sustitución de aminoácidos V205C, en donde la numeración está de acuerdo con la numeración EU. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y/o la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 150. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 148 y la región constante de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124 y la cadena ligera comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124, y la cadena ligera comprende la secuencia de SEQ ID NO: 123. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-WTA aislado comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124 y la cadena ligera comprende la secuencia de SEQ ID NO: 145.

En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo no es un isotipo IgM. En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo es un isotipo IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD o IgA (por ejemplo, IgA1 o IgA2). En algunas realizaciones de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente, el anticuerpo es producido por una célula hospedadora en cultivo celular. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula no humana. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es procariota o eucariota. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula de mamífero (por ejemplo, una célula humana o de mamífero no humano). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula CHO.

También se describe un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento. También se describe un vector que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento. El vector de expresión puede ser un vector de expresión.

También se describe una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento. La célula hospedadora puede ser procariota o eucariota. La célula hospedadora puede ser una célula de mamífero (por ejemplo, una célula humana o de mamífero no humano). En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula CHO.

También se describe un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos divulgados en el presente documento en condiciones adecuadas para la expresión del ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo producido por la célula. El método puede comprender además purificar el anticuerpo.

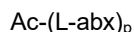
Otro aspecto de la invención es un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico (AAC) que comprende un anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA) de la invención, fijado covalentemente por un enlazador peptídico a un antibiótico de tipo rifamicina como se establece en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA) se une a *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared se une a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

En algunos ejemplos de los conjugados anticuerpo-antibiótico divulgados en el presente documento, el anticuerpo comprende: i) CDR de cadena L y cadena H de SEQ ID NO: 99-104 o ii) la VL de SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 123 emparejada con la VH de SEQ ID NO: 120 o SEQ ID NO: 156; o iii) la VL de SEQ ID NO: 111 emparejada con la VH de SEQ ID NO: 112.

En algunos ejemplos, El antibiótico de tipo rifamicina es un antibiótico de tipo rifalazil. En algunas realizaciones, el antibiótico de tipo rifamicina comprende una amina cuaternaria fijada al enlazador peptídico. En algunas realizaciones, el antibiótico está fijado al anticuerpo a través de un enlazador peptídico que está fijado a una cisteína modificada por ingeniería del anticuerpo anti-WTA. La cisteína modificada por ingeniería puede estar en la cadena L o H del anticuerpo modificado. En algunas realizaciones, el resto de cisteína está en la cadena L. En algunas realizaciones, el resto de cisteína está en la cadena H.

Los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención pueden comprender un enlazador peptídico que es un enlazador escindible por cisteína proteasa de *S. aureus*; tales enlazadores incluyen un enlazador escindible por estafopaina B o por estafopaina A. En una realización, la proteasa de *S. aureus* es una endopeptidasa. En otra realización, el enlazador es un enlazador escindible por proteasas del hospedador preferentemente un enlazador escindible por la proteasa cathepsina B humana (por ejemplo, un enlazador de dipéptido val-cit).

Una realización a modo de ejemplo de un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:



en donde:

Ac es el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared;
L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

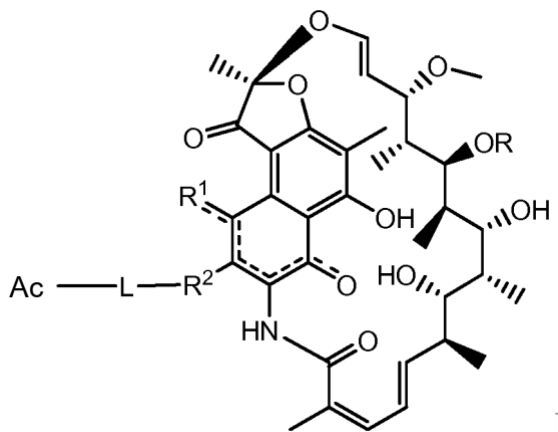
-Str-Pep-Y-

donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora;

abx es el antibiótico de tipo rifamicina; y
p es un número entero de 1 a 8.

En una realización, los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de cualquiera de los anteriores comprenden una relación antibiótico anticuerpo (AAR, por sus siglas en inglés) de 2 o 4.

En algunas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico es de la fórmula I:



en donde:

las líneas discontinuas indican un enlace opcional;

R es H, alquilo C₁-C₁₂ o C(O)CH₃;

R¹ es OH;

R² es CH=N-(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de C(O)CH₃, alquilo C₁-C₁₂, heteroarilo C₁-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀ y carbociclilo C₃-C₁₂;

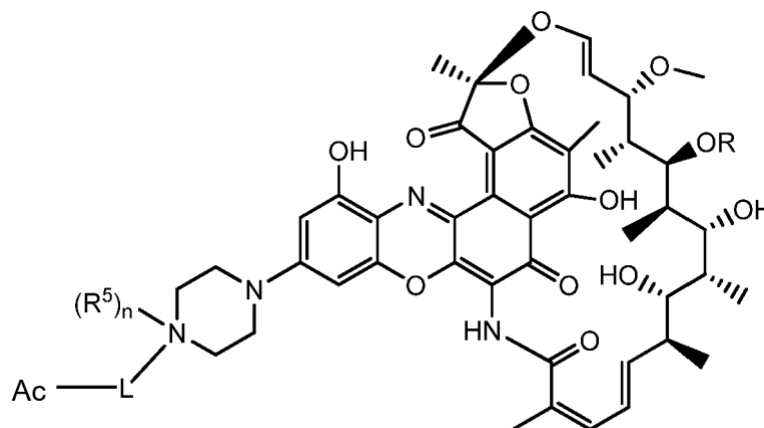
o R¹ y R² forman un heteroarilo o heterociclilo de cinco o seis miembros fusionado y formando, opcionalmente, un anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente por H, F, Cl, Br, I, alquilo C₁-C₁₂ u OH;

L es el enlazador peptídico fijado a R² o al heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R¹ y R²; y

Ac es el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA).

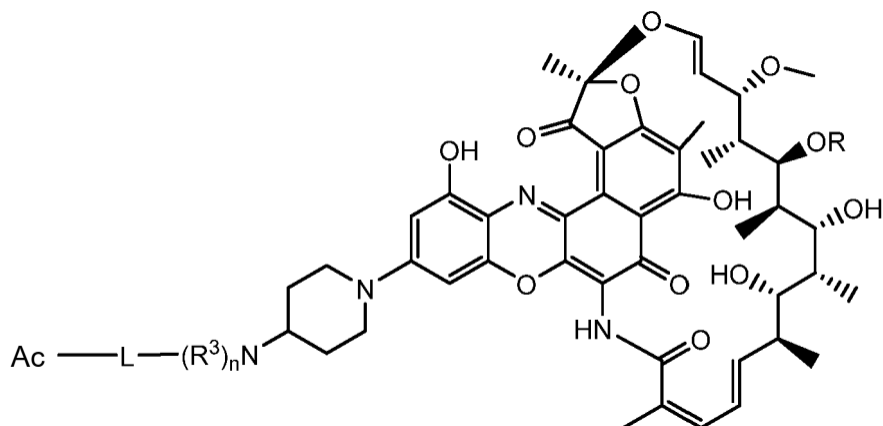
En algunas de estas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de fórmula I es de la fórmula:

En algunas de estas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de fórmula I es de la fórmula:



en donde R⁵ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₁₂; y n es 0 o 1.

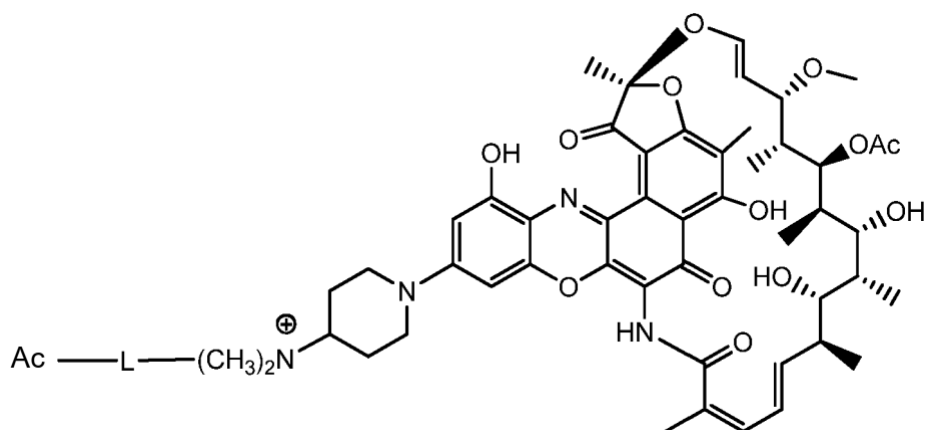
En algunas de estas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de fórmula I es de la fórmula:



5

en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y n es 1 o 2.

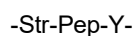
En algunas realizaciones particulares, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de fórmula I es de la fórmula:



10

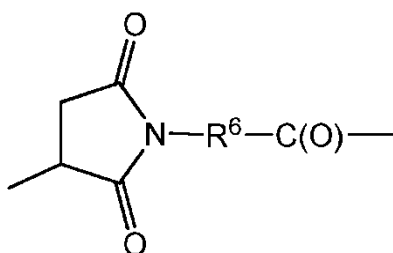
En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico (AAC) que comprende un anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA) de la invención, fijado covalentemente por un enlazador peptídico a un antibiótico de tipo rifamicina, donde el enlazador peptídico tiene la fórmula:

15



donde Str es una unidad extensora unida covalentemente al anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA); Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora fijada covalentemente al antibiótico de tipo rifamicina. En algunas de estas realizaciones, Str tiene la fórmula:

20



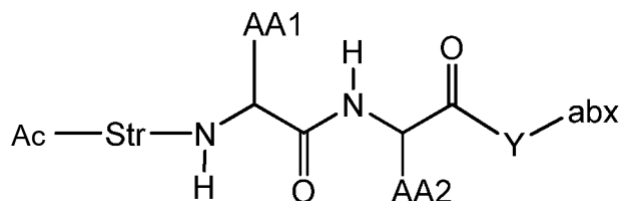
25

en donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C_1 - C_{10} , -carbociclo C_3 - C_8 , -O-(alquilo C_1 - C_8), -arileno-, -alquileo-arileno C_1 - C_{10} , -arileno-alquileo C_1 - C_{10} , -alquileo C_1 - C_{10} -(carbociclo C_3 - C_8)-, -(carbociclo C_3 - C_8)-alquileo C_1 - C_{10} -, -heterociclo C_3 - C_8 -, -alquileo C_1 - C_{10} -heterociclo (C_3 - C_8) -, -(heterociclo C_3 - C_8)-alquileo C_1 - C_{10} -, $-(CH_2CH_2O)_r$ y $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; y r es un número entero que varía de 1 a 10. En una variación, R^6 es $(CH_2)_5-$. En algunas de estas realizaciones, Pep comprende de dos a doce restos de aminoácidos seleccionados

independientemente de glicina, alanina, fenilalanina, lisina, arginina, valina y citrulina. En una variación, Pep se selecciona de valina-citrulina (val-cit, vc); fenilalanina-lisina (fk); GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126); tpm-cit; GPImeLFF (SEQ ID NO: 129); valina-citrulina-fenilalanina (val-cit-phe); GGAF (SEQ ID NO: 131); y LAFG (SEQ ID NO: 128). En algunas de estas realizaciones, Y comprende paraaminobencilo o paraaminobenciloxicarbonilo.

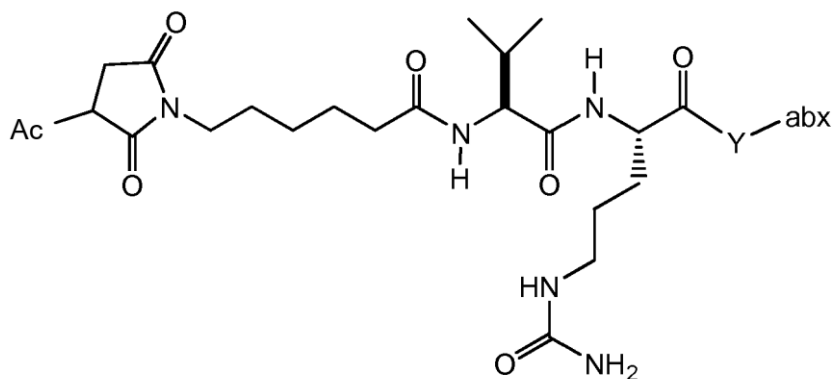
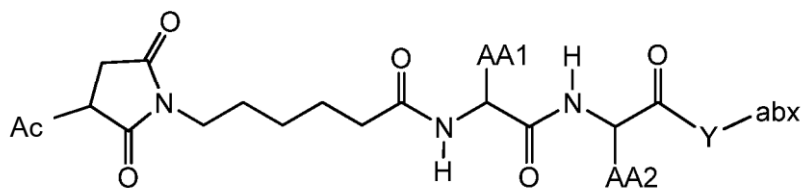
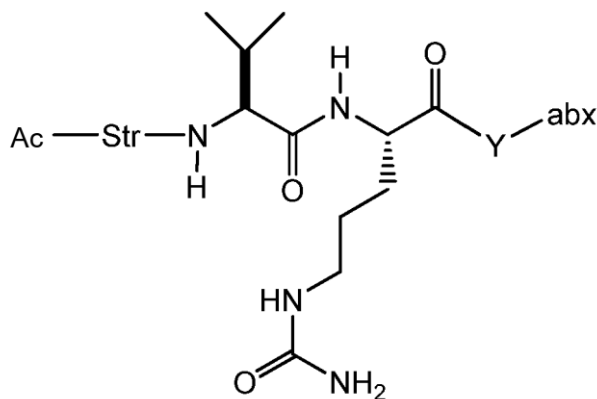
5

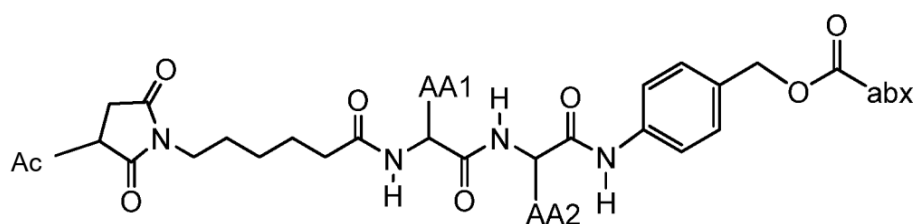
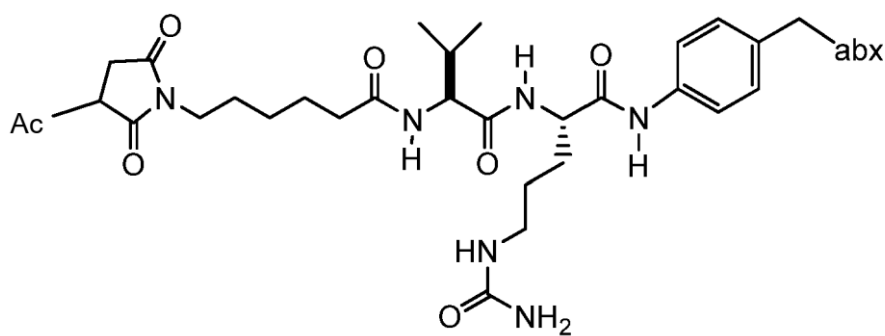
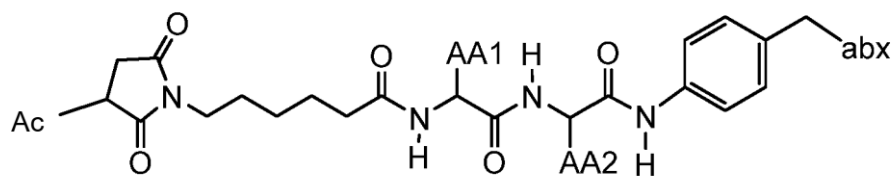
En algunas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:



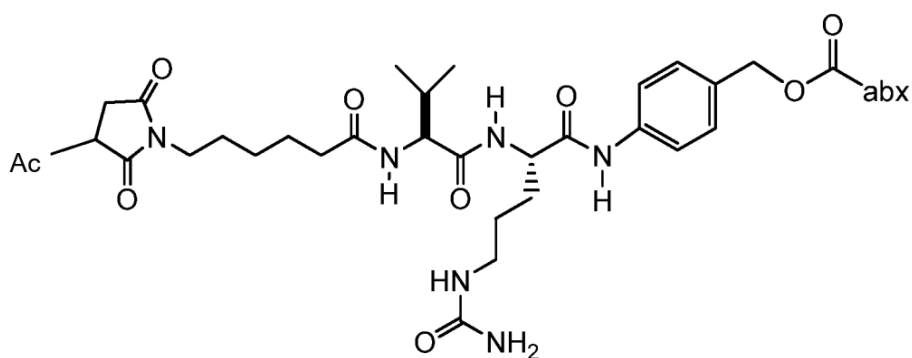
10 donde Ac, Str, Y y abx son como se definen en el presente documento, y AA1 y AA2 se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácidos. En algunas de estas realizaciones, la cadena lateral de aminoácidos se selecciona independientemente de H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, -CHCH(CH₃)CH₃ y -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂. En algunas de estas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:

15

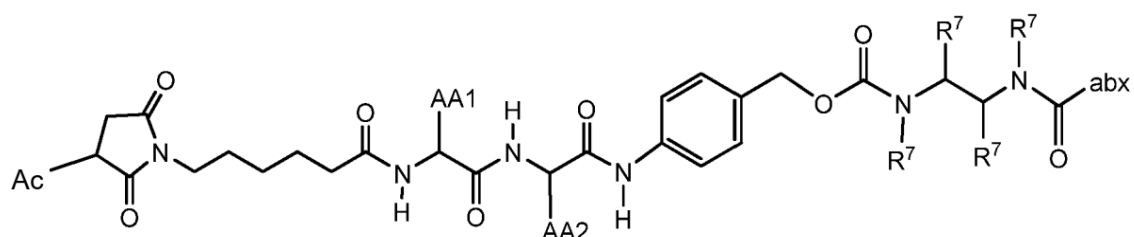




5 °

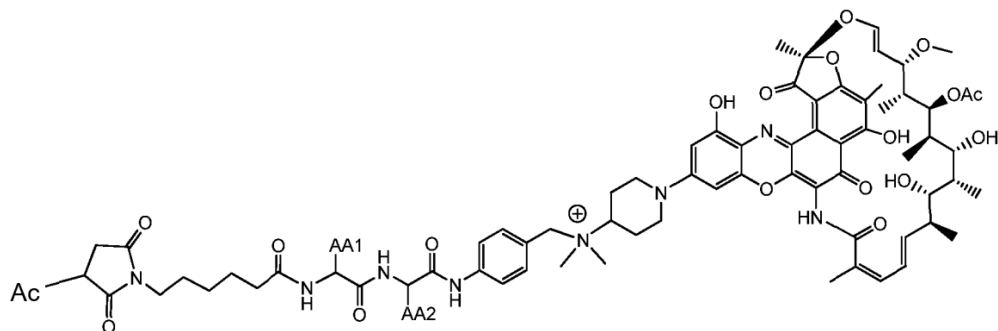
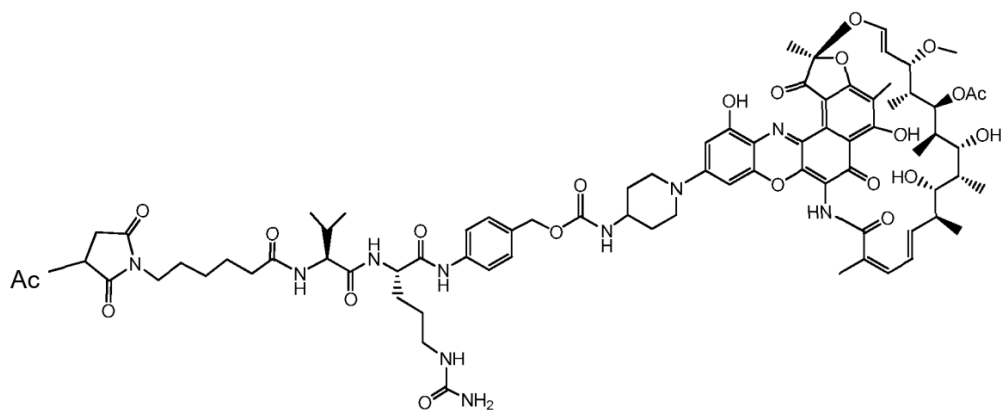
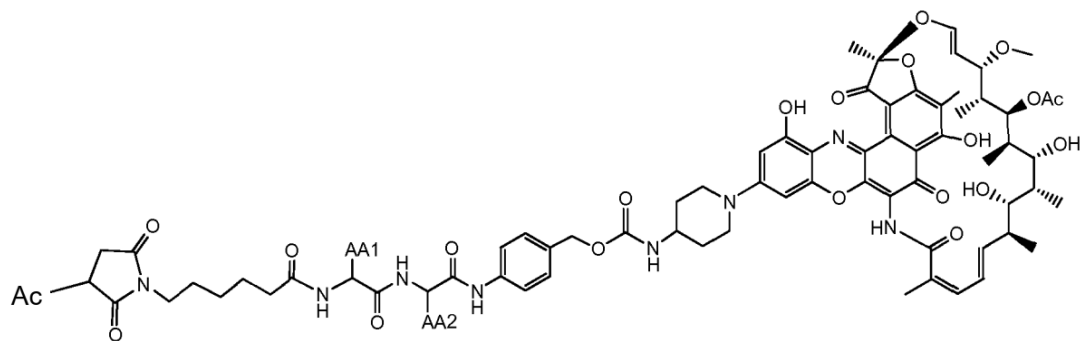


En algunas de estas realizaciones, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:



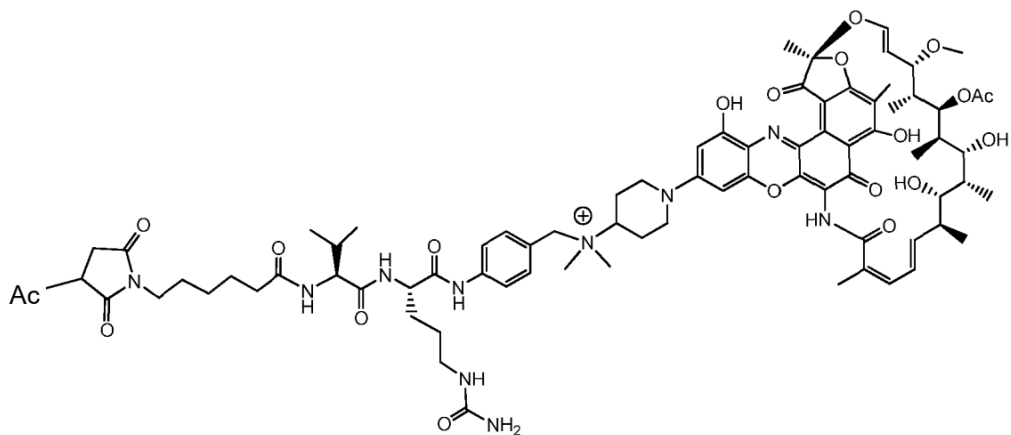
donde R^7 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} . En algunas de estas realizaciones, el compuesto

conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:



5

o



10

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-antibiótico como se establece en las reivindicaciones para su uso en un método de tratamiento de una infección bacteriana en un paciente, en donde la infección bacteriana es una infección por *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, el paciente ha sido diagnosticado con una infección por *Staphylococcus aureus*. En algunas realizaciones, tratar la infección bacteriana comprende reducir la carga bacteriana.

En un aspecto, la presente invención proporciona un conjugado anticuerpo-antibiótico como se establece en las reivindicaciones para su uso en un método de reducción del número de células bacterianas intracelulares de *Staphylococcus aureus* en las células hospedadoras de un paciente infectado por *Staphylococcus aureus* sin reducir el número de células hospedadoras. Este uso puede comprender destruir las células bacterianas persistentes (por ejemplo, estafilococo A) *in vivo* poniendo en contacto las bacterias persistentes con un AAC de cualquiera de las realizaciones anteriores.

En otra realización, el uso médico comprende además administrar un segundo agente terapéutico. En una realización adicional, el segundo agente terapéutico es un antibiótico que incluye un antibiótico contra *Staphylococcus aureus* en general o contra MRSA en particular.

En una realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención se selecciona de las clases estructurales: (i) aminoglucósidos; (ii) betalactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolonas/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas.

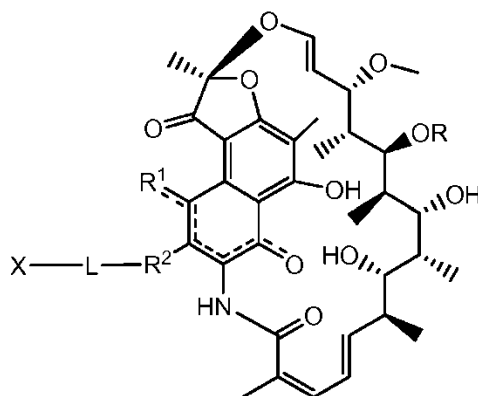
En una realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención se selecciona de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK-2140944, CG-400549, sitafloxacino, teicoplanina, triclosán, naftiridona, radezolida, doxorrubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina y azitromicina.

En algunas realizaciones en el presente documento, la carga bacteriana en el sujeto se ha reducido a un nivel indetectable después del tratamiento. En una realización, el hemocultivo del paciente es negativo después del tratamiento en comparación con un hemocultivo positivo antes del tratamiento. En algunas realizaciones en el presente documento, la resistencia bacteriana en el sujeto es indetectable o baja. En algunas realizaciones en el presente documento, el sujeto no responde al tratamiento con metilicina o vancomicina.

Otro aspecto de la invención es un proceso para preparar un anticuerpo o un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención que comprende conjugar un antibiótico de tipo rifamicina con un anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA) como se establece en las reivindicaciones.

Otro aspecto de la invención es un kit para tratar una infección bacteriana que comprende una composición farmacéutica de la invención e instrucciones para su uso como se establece en las reivindicaciones.

También se describe un producto intermedio enlazador-antibiótico que tiene la Fórmula II:



en donde:

las líneas discontinuas indican un enlace opcional;

R es H, alquilo C₁-C₁₂ o C(O)CH₃;

R¹ es OH;

R² es CH=N-(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos

seleccionados independientemente de $C(O)CH_3$, alquilo C_1-C_{12} , heteroarilo C_1-C_{12} , heterociclilo C_2-C_{20} , arilo C_6-C_{20} y carbociclilo C_3-C_{12} ;

o R^1 y R^2 forman un heteroarilo o heterociclilo de cinco o seis miembros fusionado y formando, opcionalmente, un anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente por H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12} u OH;

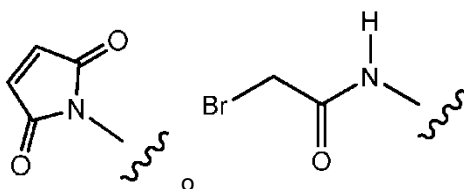
L es un enlazador peptídico fijado a R^2 o al heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R^1 y R^2 ; y que tiene la fórmula:



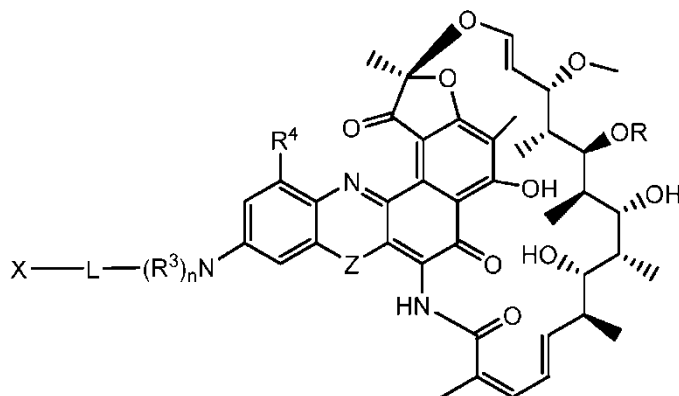
donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora; y

X es un grupo funcional reactivo seleccionado de maleimida, tiol, amino, bromuro, bromoacetamido, yodoacetamido, p-toluenosulfonato, yoduro, hidroxilo, carboxilo, piridil disulfuro y N-hidroxisuccinimida.

En algunos de los intermedios enlazador-antibiótico de Fórmula II, X es



El producto intermedio enlazador-antibiótico de Fórmula II puede tener la fórmula:



en donde

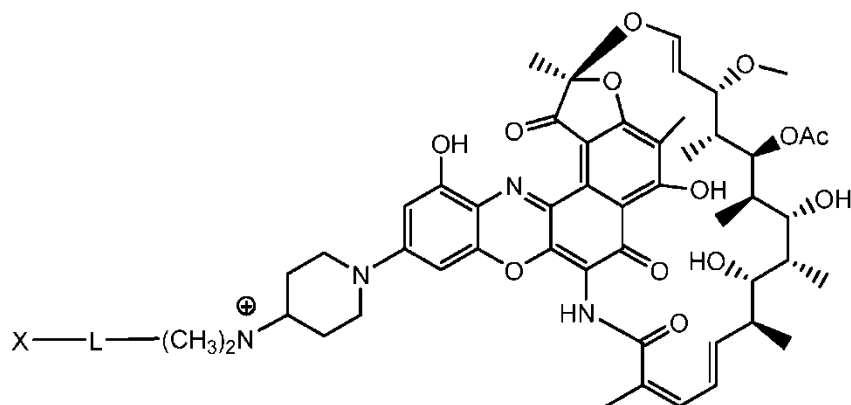
R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_{12} ;

n es 1 o 2;

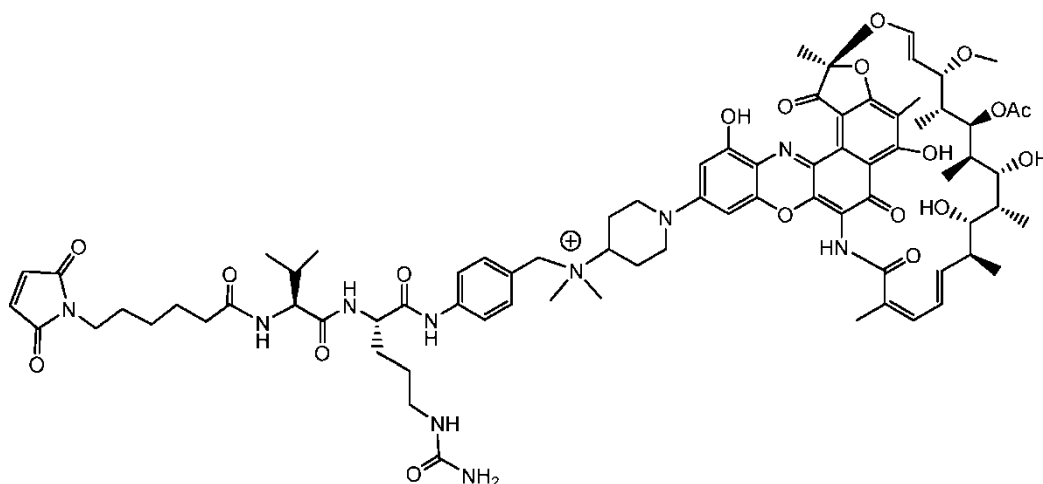
R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12} y OH; y

Z se selecciona de NH, N(alquilo C_1-C_{12}), O y S.

El producto intermedio enlazador-antibiótico de Fórmula II puede tener la fórmula:



o



5

También se proporciona un método para destruir *Staphylococcus aureus* intracelular en las células hospedadoras de un paciente infectado *Staphylococcus aureus* sin destruir las células hospedadoras que comprende administrar un conjugado anti-WTA-antibiótico detallado en el presente documento.

10 Debe entenderse que una, algunas, o todas las propiedades de las diferentes realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia.

Breve descripción de los dibujos

15

La Figura 1 muestra que la exposición a vancomicina o rifampicina destruye el MRSA gradualmente. La vancomicina se probó a 2 µg/ml (cuadrado abierto) y 20 µg/ml (cuadrado cerrado). La rifampicina se probó a 0,02 µg/ml (triángulo abierto) y 0,2 µg/ml (triángulo cerrado).

20

La Figura 2 muestra que las células peritoneales infectadas fueron capaces de transferir la infección a los osteoblastos en presencia de vancomicina.

La Figura 3 muestra la pared celular de bacterias Gram positivas, tal como *S. aureus* con una representación en dibujo de los ácidos teicoicos de la pared (WTA), del ácido lipoteicoico (LTA) y de las vainas de Peptidoglicano (PGN) que estabilizan la membrana celular y proporcionan sitios de unión.

25

La Figura 4 muestra la estructura química y las modificaciones de glucosilo del Ácido Teicoico de Pared (WTA), descrito en detalle en Definiciones.

La Figura 5 muestra un posible mecanismo de activación del fármaco para conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC). El antibiótico activo (Abx) se libera después de la internalización del AAC dentro de las células de mamíferos.

30

Las Figuras 6A y 6B resumen las características de los Ac de la exploración primaria de una biblioteca de Ac que muestran una unión ELISA positiva a las preparaciones de la pared celular de las cepas de *S. aureus*, cepa USA300 o Wood46, tal se describe en el ejemplo 21. De los Ac que se unen a WTA, 4 son específicos de WTA alfa y 13 se unen específicamente a WTA beta.

La figura 7A muestra un ensayo de macrófagos *in vitro* que demuestra que AAC destruye MRSA intracelular.

La Figura 7B muestra la destrucción intracelular de MRSA (cepa USA300) con 50 µg/ml del AAC **102**io-S4497-HC-A118C-pipBOR en macrófagos, osteoblastos (MG63), células epiteliales de las vías respiratorias (A549) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en comparación con el anticuerpo anti-WTA S4497, no marcado, sin conjugar. La línea discontinua indica el límite de detección para el ensayo.

La Figura 7C muestra la comparación de AAC realizados con los productos intermedios enlazador- antibiótico LA-**51** y LA-**54** (Tabla 2). MRSA se opsonizó con el anticuerpo S4497 solo o con AAC: AAC-**102** o AAC-**105** (Tabla 3) a diversas concentraciones que varían de 10 µg/ml a 0,003 µg/ml.

La Figura 7D muestra que AAC destruye las bacterias intracelulares sin dañar los macrófagos.

La Figura 7E muestra la recuperación de USA300 vivas del interior de macrófagos a partir de la lisis de células de macrófagos anterior. Se recuperaron pocos (10.000 veces menos) *S. aureus* vivos de macrófagos infectados con bacterias opsonizadas con S-4497-AAC en comparación con los controles tratados con anticuerpos no marcados.

La figura 8A muestra la eficacia *in vivo* de AAC **102**io-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR en un modelo de infección intraperitoneal en ratones A/J. Los ratones se infectaron con MRSA mediante inyección intraperitoneal y se trataron con 50 mg/kg de anticuerpo S4497 solo o con 50 mg/kg de AAC **102** (HC-A114C Kabat = HC-A118C EU) por inyección intraperitoneal. Los ratones se sacrificaron 2 días después de la infección y se evaluó la carga bacteriana total en el sobrenadante peritoneal (bacterias extracelulares), en las células peritoneales (bacterias intracelulares) o en el riñón.

La Figura 8B muestra un modelo de infección intravenosa, *in vivo*, en ratones A/J. Los ratones se infectaron con MRSA por inyección intravenosa y se trataron con 50 mg/Kg de anticuerpo S4497, 50 mg/Kg de AAC **102** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR o con una mezcla simple de 50 mg/Kg de anticuerpo S4497 + 0,5 mg/Kg de rifamicina libre. La línea discontinua gris indica el límite de detección para cada órgano.

La Figura 9A muestra la eficacia de AAC **102** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR en un modelo de infección intravenosa por titulación del AAC S4497-pipBOR.

La Figura 9B muestra que AAC **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es más eficaz que AAC **102** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR, en un modelo de infección intravenosa por titulación. Los tratamientos con el anticuerpo S4497, AAC **102** o AAC **112** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetil-pipBOR se administraron a las dosis indicadas 30 minutos después de la infección. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes por ratón (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas.

La Figura 9C muestra que AAC **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es más eficaz que el anticuerpo S4497 o antibiótico dimetilpipBOR 7 solo en un modelo de infección intravenosa. Ratones CB17.SCID ratones infectados con 2×10^7 UFC de MRSA por inyección intravenosa. Un día después de la infección, los ratones se trataron con 50 mg/Kg de anticuerpo S4497, 50 mg/Kg de AAC **105** o con 0,5 mg/Kg de dimetil-pipBOR 7, la dosis equivalente de antibiótico contenida en 50 mg/Kg de AAC). Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes por ratón (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas.

La Figura 10A muestra la prevalencia de anticuerpos anti-*S. aureus* en suero humano. Los pacientes infectados por *S. aureus* o los controles normales contienen altas cantidades de anticuerpo sérico específico de WTA con la misma especificidad que S4497 anti-WTA. Se examinó la unión de varias muestras de suero de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) a MRSA que expresaban el antígeno de S4497 frente a la unión a un mutante de la cepa de MRSA TarM/TarS DKO (doble nuligénica) que carece de las modificaciones de azúcares que reconoce el anticuerpo S4497.

La Figura 10B muestra que un AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana (10 mg/ml) en un ensayo de macrófagos *in vitro* con la cepa USA300 de MRSA. El **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es eficaz en presencia de 10 mg/ml de IgG humana. La cepa USA300 de MRSA se opsonizó con AAC solo o con AAC diluido en 10 mg/ml de IgG humana. El número total de bacterias intracelulares supervivientes se evaluó 2 días después de la infección.

La figura 10C muestra un modelo de infección *in vivo* que demuestra que AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana. Los datos combinados son de 3 experimentos independientes que usan dos preparaciones por separado de AAC **105** u **112** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR. Los ratones tratados con el AAC tuvieron una reducción mayor de 4 en escala logarítmica en las cargas bacterianas (Prueba t de Student p = .0005).

La figura 11A muestra el modelo de infección *in vivo* que demuestra que los AAC son más eficaces que el antibiótico vancomicina de tratamiento de referencia (SOC, por sus siglas en inglés) actual en ratones que se reconstituyen con niveles normales de IgG humana. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/Kg), vancomicina (100 mg/Kg), AAC **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR (50 mg/Kg) o con un AAC preparado con un anticuerpo de control de isotipo que no reconoce MRSA, AAC **110** tio-hu-anti gD 5B5-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR (50 mg/Kg).

La figura 11B muestra la unión relativa de anticuerpos *anti-Staphylococcus aureus* anticuerpos a la cepa USA300 aislada de riñones en un modelo de infección *in vivo*, tal como se determina por FACS. El anticuerpo S4497 reconoce una modificación de N-acetilglucosamina que está enlazada al ácido teicoico de la pared (WTA) a través de un enlace beta-anomérico en la pared celular de *S. aureus*. El anticuerpo S7578 se une a una modificación similar de N-acetilglucosamina que se une a WTA a través de un enlace alfa-anomérico. El anticuerpo rF1 es un anticuerpo anti-MRSA de control positivo que reconoce las modificaciones de azúcares encontradas en una familia de proteínas ancladas a la pared celular que contienen repetición de SDR. El

anticuerpo gD es una IgG₁ humana de control negativo que no reconoce *S. aureus*.

La figura 11C muestra el modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC, **129** tio-S6078-HC A1 14C-LCWT-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es más eficaz que el anticuerpo S4497 anti-WTA no marcado, de acuerdo con el mismo régimen que la Figura 11A, en ratones que se reconstituyen con niveles normales de IgG humana. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/Kg) o con AAC **129** tio-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR (50 mg/Kg).

La Figura 12 muestra un ensayo de inhibición del crecimiento que demuestra que los AAC no son tóxicos para *S. aureus* a menos que el enlazador se escinda por la catepsina B. A la izquierda se muestra un ensayo esquemático de liberación de catepsina (Ejemplo 20). El AAC se trata con catepsina B para liberar antibiótico libre. La cantidad total de actividad antibiótica en el AAC intacto frente al tratado con catepsina B se determina preparando diluciones en serie de la reacción resultante y determinando la dosis mínima de AAC que puede inhibir el crecimiento de *S. aureus*. El gráfico superior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para 102 tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR y el gráfico inferior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR.

La Figura 13A muestra una alineación de secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera (VL) de cuatro anticuerpos anti-WTA alfa humanos (SEQ ID NO: 25, 27, 29 y 31, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias CDR, CDRL1, L2 y L3 de acuerdo con la numeración de Kabat están subrayadas.

La Figura 13B muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) de los cuatro anticuerpos anti-WTA alfa humanos de la Figura 13A. Las secuencias CDR, CDR H1, H2 y H3 según la numeración de Kabat están subrayadas (SEQ ID NO: 26, 28, 30 y 32, respectivamente, en orden de aparición).

La Figura 14 muestra las secuencias CDR de las cadenas L y H de 13 anticuerpos anti-WTA beta humanos (SEQ ID NO: 33-110).

Las Figuras 15A-1 y 15A-2 muestran una alineación de la cadena L de longitud completa (cadena ligera) del Ac 6078 anti-WTA beta (sin modificar) y sus variantes, v2, v3, v4 (SEQ ID NO: 113, 113, 115, 113, 115, 113, 115 y 115, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias CDR, CDRL1, L2 y L3 de acuerdo con la numeración de Kabat están subrayadas. Los recuadros muestran los restos de contacto y los restos de las CDR de acuerdo con Kabat y Chothia. Las variantes de la cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 205 en este caso).

La designación variante, por ejemplo, v2LC-Cys significa la variante 2 que contiene una Cys modificada por ingeniería en la cadena L. HCLC-Cys significa que cada una de las cadenas H y L contiene una Cys modificada por ingeniería. Las variantes 2, 3 y 4 tienen cambios en el inicio de la cadena H como se muestra en las Figuras 15B.

Las Figuras 15B-1, 15B-2, 15B-3, 15B-4 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa (cadena pesada) del Ac 6078 anti-WTA beta (sin modificar) y sus variantes, v2, v3, v4 (SEQ ID NO: 114, 139-144 y 143, respectivamente, en orden de aparición) que tienen cambios en el inicio de la cadena H. Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 118 en este caso).

Las Figuras 16A-1 y 16A-2 muestran una alineación de la cadena L de longitud completa del Ac 4497 anti-WTA beta (sin modificar) y las cadenas L modificadas por ingeniería con Cys (SEQ ID NO: 121, 123, 145 y 145, respectivamente, en orden de aparición). Las secuencias CDR, CDRL1, L2 y L3 de acuerdo con la numeración de Kabat están subrayadas. Los recuadros muestran los restos de contacto y los restos de las CDR de acuerdo con Kabat y Chothia. Las variantes de la cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro punteado al final de la región constante (en el resto EU n.º 205 en este caso).

Las Figuras 16B-1, 16B-2, 16B-3 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa del Ac anti-WTA beta 4497 (sin modificar) y su variante v8 con D alterada a E en la posición 96 de CDR H3, con o sin la Cys modificada por ingeniería (SEQ ID NO: 146-147, 157 y 147, respectivamente, en orden de aparición). Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 118 en este caso).

Las Figuras 17A-1, 17A-2, 17A-3 muestran una alineación de las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de longitud total de los trece anticuerpos anti-WTA beta humanos (SEQ ID NO: 113, 158-167, 121 y 168, respectivamente, en orden de aparición). La región variable (VL) abarca las posiciones de aminoácidos de Kabat 1 a 107. Las secuencias CDR, CDRL1, L2 y L3 de acuerdo con la numeración de Kabat están subrayadas.

Las Figuras 17B-1 a 17B-6 muestran una alineación de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de los trece anticuerpos anti-WTA beta humanos de las Figuras 17A-1, 17A-2, 17A-3 (SEQ ID NO: 114, 169-176, 133-134, 138 y 127, respectivamente, en orden de aparición). La región variable (VH) abarca las posiciones de aminoácidos de Kabat 1-113. Las secuencias CDR, CDR H1, H2 y H3 de acuerdo con la numeración de Kabat están subrayadas. La posición Eu 118 de la cadena H marcada con un asterisco se puede cambiar a Cys para la conjugación de fármacos. Los restos resaltados en negro se pueden reemplazar con otros restos que no afectan la unión del antígeno para evitar la desamidación, isomerización del ácido aspártico, oxidación o glicosilación ligada a N.

La Figura 18A muestra la unión de mutantes de Ac 4497 a la pared celular de *S. aureus* según se analiza mediante ELISA.

La Figura 18B muestra una comparación de Ac 4497 y sus mutantes (SEQ ID NO: 177, 177, 177-178, 178-179, 179-180, 180 y 180, respectivamente, en orden de aparición) en las posiciones destacadas de aminoácidos y su fuerza de unión a antígeno relativa según se prueba por ELISA.

La Figura 19 muestra los resultados del análisis FACS de Ac 6078 de tipo silvestre (WT) y mutantes que se unen a la cepa deficiente de proteína A de USA300 (USA300-SPA), tal se describe en el ejemplo 23. Los mutantes mostraron una unión intacta a *S. aureus*.

La Figura 20 muestra que el tratamiento previo con 50 mg/kg de anticuerpos libres no es eficaz en un modelo de infección intravenosa. Los ratones Balb/c recibieron una dosis única de vehículo control (PBS) o 50 mg/kg de anticuerpos por inyección intravenosa 30 minutos antes de la infección con 2×10^7 UFC de USA300. Los grupos de tratamiento incluyeron un anticuerpo de control de isotipo que no se une a *S. aureus* (gD), un anticuerpo dirigido contra la modificación beta del ácido teicoico de la pared (4497) o un anticuerpo dirigido contra la modificación alfa del ácido teicoico de la pared (7578). Los ratones control recibieron tratamientos dos veces al día con 110 mg/kg de vancomicina mediante inyección intraperitoneal (Vanco).

La Figura 21 y la Figura 22 muestran que los AAC dirigidos contra la modificación beta del ácido teicoico de la pared o contra la modificación alfa del ácido teicoico de la pared son eficaces en un modelo de infección intravenosa que usa ratones reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero y se infectaron con 2×10^7 UFC de USA300 por inyección intravenosa. El tratamiento se inició 1 día después de la infección con control de solo tampón (PBS), 60 mg/Kg de AAC de WTA-beta (AAC 136) o 60 mg/Kg de AAC de WTA-alfa (AAC 155).

La Figura 23A y la Figura 23B muestran la síntesis del producto intermedio enlazador-antibiótico **51** a partir de 2-nitrobenceno-1,3-diol **1**.

La Figura 24 muestra la síntesis del producto intermedio enlazador-antibiótico, MC-vc-PAB-dimetilpipBOR **54** a partir de benzoxazina rifamicina **4** protegida con TBS.

La Figura 25A y la Figura 25B muestran la síntesis de dimetil pipBOR **7** a partir de (5-fluoro-2-nitro-1,3-fenilén)bis(oxi)bis(metilen)dibenceno **9**.

La Figura 26 muestra la estructura de un sustrato peptídico de FRET para la validación de la escisión, mal-K(TAMRA)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEQ ID NO: 125) que contiene los restos más abundantes en PI, P2 y P3 a partir de la exploración REPLi de la actividad proteasa. Se conservaron los restos de Gly flanqueantes de la estructura REPLi del péptido de FRET. Un grupo de maleimida reactivo con tiol en el extremo N permitió la conjugación de los anticuerpos con cisteínas reactivas. Tras la escisión del péptido de FRET, se pierde el efecto desactivador y se observa un aumento en la fluorescencia.

La Figura 27 muestra la estructura de tioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126), un compuesto instrumental utilizado para identificar fracciones activas que contienen la proteasa de interés. Mal-GGAFAGGGDNA31 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) se conjugó con THIOFAB 4497. Los THIOFAB contienen una cisteína reactiva. La proteasa de *S. aureus* escindió el enlazador C-terminal a Ala, liberando Gly-Gly-Gly-(pipBOR).

La Figura 28 y la Figura 29 muestran AAC Mal-K(tamra)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEQ ID NO: 125) que se escinden en Wood46 (Figura 28) y USA300 (Figura 29) cuando se conjugan con un anticuerpo que se une a *S. aureus* (tio-S4497) y no cuando se conjugan con un anticuerpo que no se une a *S. aureus* (tio-trastuzumab). Intensidad de fluorescencia medida a lo largo del tiempo de tioMAB 4497 mal-K(tamra)GGAFAGGGK (fluoresceína) (SEQ ID NO: 125) incubado con cultivos en fase logarítmica de MRSA Wood46 y USA300. Los conjugados tioMAB 4497 péptido de FRET preparados a partir de malK(TAMRA)GGAFAGGGK(fluoresceína) (SEQ ID NO: 125) de la Figura 26 muestran un aumento en la fluorescencia en ambas cepas, indicando que el enlazador experimental se escinde por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en la cepa clínicamente relevante de MRSA, USA300 (Figura 29). La densidad celular afecta la tasa de escisión, produciéndose la escisión antes en cultivos de mayor densidad celular (10^8 células/ml). El conjugado de control de isotipo (tio-trastuzumab) no mostró un aumento de la fluorescencia en ninguna condición.

La Figura 30 muestra dos enlazadores optimizados para la escisión por estafopaina B en AAC. Enlazadores optimizados para escisión por estafopaina B, incluyendo las preferencias de restos para P4 y P1'. Los enlazadores se diseñaron usando datos de la exploración REPLi. QSY7 se añadió al extremo C de cada enlazador para actuar como un sustituto de antibiótico.

La Figura 31 muestra los resultados del ensayo de macrófagos, demostrando que el AAC escindible por estafopaina es capaz de destruir bacterias intracelulares. La cepa USA300 de *S. aureus* se incubó con diferentes dosis (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml o 0,1 µg/ml) de anticuerpo S4497 solo, AAC-192 tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) o AAC-193 tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) para permitir la unión de los AAC a la bacteria (Figura 31). Después de 1 hora de incubación, las bacterias opsonizadas se proporcionaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de completar la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después sembrando en placa diluciones en serie de los lisados de macrófagos sobre placas de Agar de Soja Triptico. El AAC escindible por estafopaina fue capaz de destruir las USA300 intracelular con una potencia similar en comparación con el AAC escindible por catepsina B. La línea discontinua gris indica el límite de detección para el ensayo (10 UFC/pocillo).

La Figura 32 muestra los resultados del ensayo de macrófagos, demostrando que el AAC escindible por estafopaina es capaz de destruir bacterias intracelulares. Los AAC dirigen la destrucción por antibiótico de *S. aureus* a través de la unión del anticuerpo específica de antígeno. Se eligió la cepa Wood46 de *S. aureus* para este experimento porque no expresa la proteína A, una molécula que se une a la región Fc de los anticuerpos

IgG. La cepa Wood46 de *S. aureus* se incubó con 10 µg/ml o 0,5 µg/ml de anticuerpo S4497, AAC de control de isotipo que contiene un enlazador escindible por catepsina B, AAC-101 tio-trastuzumab HC A118C-MCvc-PAB-(dimetil-pipBOR), AAC-192 tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR), AAC de control de isotipo que contiene un enlazador escindible por estafopaina, tio-trastuzumab HC A118C-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128), o AAC-193 tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) durante 1 hora para permitir la unión de los AAC a las bacterias. Para limitar la unión no específica de los AAC, las bacterias opsonizadas se centrifugaron, se lavaron una vez y se resuspendieron en tampón antes de que se proporcionaran a los macrófagos murinos. Después de completar la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después sembrando en placa diluciones en serie de los lisados de macrófagos sobre placas de Agar de Soja Tríptico. El 4497-AAC que contiene un enlazador escindible por estafopaina fue capaz de destruir todas las bacterias intracelulares detectables, mientras que el AAC de control de isotipo no mostró actividad.

Las Figuras 33 y 34 muestran que AAC escindible por estafopaina está activo *in vivo* en un modelo murino de infección intravenosa. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron tratados con anticuerpo 4497 (50 mg/kg), AAC-215 con enlazador escindible por estafopaina (50 mg/kg) o un control de isotipo, AAC anti-gD que contiene un enlazador escindible por estafopaina (50 mg/kg). Los ratones recibieron una dosis única de AAC-215 el día 1 después de la infección por inyección intravenosa. El número total de bacterias supervivientes en 2 riñones (Figura 33) o en el corazón (Figura 34) se determinó mediante siembra en placas.

Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados del Ensayo de macrófagos *in vitro* para AAC tio-S6078. En la figura 35, el AAC tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) fue eficaz para destruir bacterias intracelulares a dosis iguales o superiores a 0,5 µg/ml con una carga antibiótica de 2,0 (AAC-173) o 3,9 (AAC-171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA-54) por anticuerpo tio-S6078. En la figura 36, tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(piperazBOR) fue eficaz para destruir bacterias intracelulares a dosis iguales o superiores a 0,5 µg/ml con una carga antibiótica de antibióticos piperazBOR (LA-65) de 1,8 (AAC-174) o 3,9 (AAC-172) por anticuerpo tio-S6078.

Las Figuras 37 y 38 muestran resultados de la eficacia *in vivo* de AAC tio-S6078 en un modelo murino de infección intravenosa. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron infectados con USA300 y tratados con vehículo control (PBS), AAC tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) con una carga antibiótica de 2,0 (AAC-173) o 3,9 (AAC-171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA-54) por anticuerpo tio-S6078 (Figura 37) y tio -S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(piperazBOR) con una carga antibiótica de 1,8 (AAC-174) o 3,9 (AAC-172) de antibióticos piperazBOR (LA-65) por anticuerpo tio-S6078 (Figura 38). Los ratones recibieron una dosis única de AAC el día 1 después de la infección mediante inyección intravenosa y se sacrificaron el día 4 después de la infección. El número total de bacterias supervivientes en 2 riñones se determinó mediante siembra en placas. El tratamiento con AAC que contenían una carga antibiótica más baja redujo las cargas bacterianas en aproximadamente 1.000 veces y el tratamiento con AAC que contenían una carga antibiótica más alta redujo las cargas bacterianas en más de 10.000 veces.

Descripción detallada de las realizaciones de la invención

A continuación, se hará referencia con detalle a determinadas realizaciones de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, incluyendo métodos, materiales y ejemplos, dicha descripción no es limitante y la invención está destinada a abarcar todas las alternativas, modificaciones y equivalentes, si son generalmente conocidos o incorporados en el presente documento. En el caso de que uno o más de la bibliografía, patentes y materiales similares incorporados difieran o contradigan la presente solicitud, incluyendo, pero sin limitación los términos definidos, el uso de los términos, las técnicas descritas o similares, la presente solicitud será la determinante. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos.

I. TÉCNICAS GENERALES

Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento generalmente se comprenden bien y se emplean comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª Edición (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, and *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis*

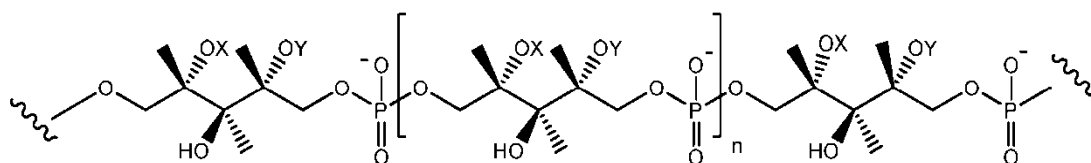
(M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); and Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

La nomenclatura usada en esta solicitud se basa en la nomenclatura sistemática de la IUPAC, a menos que se indique lo contrario. A menos que se definan de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención y son coherentes con: Singleton et al (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2.^a Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immunobiology, 5^a ed., Garland Publishing, Nueva York.

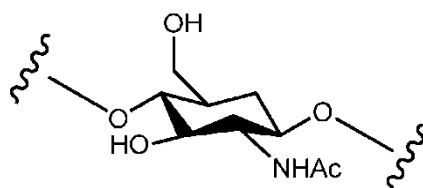
II. DEFINICIONES

Cuando se indica el número de sustituyentes, la expresión "*uno o más*" se refiere al intervalo desde un sustituyente hasta el mayor número de sustitución posible, es decir, reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por los sustituyentes. El término "*sustituyente*" indica un átomo o un grupo de átomos que reemplaza un átomo de hidrógeno en la molécula precursora. El término "*sustituido*" indica que un grupo específico lleva uno o más sustituyentes. Cuando cualquier grupo pueda portar múltiples sustituyentes y se proporcione varios posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan de manera independiente y no necesitan ser los mismos. La expresión "*sin sustituir*" significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. La expresión "*opcionalmente sustituido*" significa que el grupo especificado no está sustituido o está sustituido por uno o más sustituyentes, elegido independientemente del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, la expresión "*uno o más*" significa desde un sustituyente hasta el mayor número de sustitución posible, es decir, reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por los sustituyentes.

La expresión "ácido teicoico de pared" (WTA) significa glicopolímeros aniónicos que están fijados covalentemente al peptidoglicano a través de enlace fosfodiéster al hidroxilo C6 de los azúcares del ácido N-acetil-murámico. Si bien la estructura química precisa puede variar entre organismos, en una realización, el WTA es un ácido teicoico de ribitol con unidades repetitivas de enlaces 1,5-fosfodiéster de D-ribitol y D-alanil éster en la posición 2 y sustituyentes de glicosilo en la posición 4. Los grupos glicosilo pueden ser N-acetilglucosaminil α (alfa) o β (beta) como están presentes en *S. Aureus*. Los hidroxilos en las repeticiones de alditol/alcohol de azúcar fosfato se sustituyen con ésteres catiónicos de D-alanina y monosacáridos, tales como N-acetilglucosamina. En un aspecto, los sustituyentes hidroxilo incluyen D-alanilo y alfa (α) o beta (β) GlcNHAc. En un aspecto específico, WTA comprende un compuesto de la fórmula:



donde las líneas onduladas indican unidades de repetición de enlace o los sitios de fijación de polialditol-P o el peptidoglicano, donde X es D-alanilo o -H; e Y es α (alfa)-GlcNHAc o β (beta)-GlcNHAc.



GlcNHAc

En *S. aureus*, el WTA se une covalentemente al 6-OH del ácido N-acetil-murámico (MurNAc) a través de un disacárido compuesto por N-acetilglucosamina (GlcNAc)-1-P y N-acetilmanosamina (ManNAc), que está seguido por dos o tres unidades de glicerol-fosfato. El polímero WTA real se compone entonces de 11-40 unidades de repetición de ribitol-fosfato (Rbo-P). La síntesis gradual de WTA se inicia primero por la enzima llamada TagO y las cepas de

S. aureus que carecen del gen TagO (por eliminación artificial del gen) no producen ningún WTA. Las unidades de repetición pueden adaptarse adicionalmente con D-alanina (D-Ala) en C2-OH y/o con N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4-OH a través de enlaces glucosídicos α -(alfa) o β -(beta). Dependiendo de la cepa de *S. aureus* o de la fase de crecimiento de la bacteria, los enlaces glucosídicos podrían ser α -, β -, o una mezcla de los dos anómeros.

El término "antibiótico" (abx o Abx) incluye cualquier molécula que inhibe específicamente el crecimiento de o destruye los microorganismos, tales como bacterias, pero no es letal para el hospedador a la concentración e intervalo de dosificación administrados. En un aspecto específico, un antibiótico no es tóxico para el hospedador a la concentración e intervalos de dosificación administrados. Los antibióticos eficaces contra las bacterias pueden clasificarse ampliamente como bactericidas (es decir, destruye directamente) o bacteriostáticos (es decir, evita la división). Los antibióticos antibactericidas se pueden subclasificar adicionalmente como de espectro reducido o de amplio espectro. Un antibiótico de amplio espectro es eficaz contra una amplia gama de bacterias, incluidas las bacterias tanto Gram positivas como Gram-negativas, a diferencia de un antibiótico de espectro reducido, que es eficaz contra una gama más pequeña o familias específicas de bacterias. Ejemplos de antibióticos incluyen: (i) aminoglucósidos, por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromicina, (ii) ansamicinas, por ejemplo, geldanamicina, herbimicina, (iii) carbacefémicos, por ejemplo, loracarbef, (iv), carbapenémicos, por ejemplo, ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina, meropenem, (v) cefalosporinas (primera generación), por ejemplo, cefadroxilo, cefazolina, cefalotina, cefalexina, (vi) cefalosporinas (segunda generación), por ejemplo, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, (vi) cefalosporinas (tercera generación), por ejemplo, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftioxa, (vii) cefalosporinas (cuarta generación), por ejemplo, cefepima, (viii), cefalosporinas (quinta generación), por ejemplo, ceftobiprol, (ix) glucopéptidos, por ejemplo, teicoplanina, vancomicina, (x) macrólidos, por ejemplo, axitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomicina, (xi) monobactamas, por ejemplo, axtreonam, (xii) penicilinas, por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, axlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, metilicina, nafcilina, oxacilina, penicilina, peperacilina, ticarcilina, (xiii) polipéptidos antibióticos, por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B, (xiv) quinolonas, por ejemplo, ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacina, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacina, trovafloxacino, (xv) sulfonamidas, por ejemplo, mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), (xvi) tetraciclinas, por ejemplo, desmeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y (xvii) otros tales como arspenamina, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, furazolidona, isoniazid, linezolid, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampina/rifampicina o tinidazol.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo de WTA" se refiere a cualquier anticuerpo que se una a WTA, ya sea WTA alfa o WTA beta. Las expresiones "anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared alfa" o "anticuerpo anti-WTA alfa" o "anticuerpo anti-aWTA" o "anticuerpo anti-WTA aGlcNAc" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo que se une específicamente a ácidos teicoicos de pared (WTA) alfa. De manera análoga, las expresiones "anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared beta" o "anticuerpo anti-WTA beta" o "anticuerpo anti- β WTA" o "anticuerpo anti-WTA β GlcNAc" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo que se une específicamente a ácidos teicoicos de pared (WTA) beta. Las expresiones "anticuerpo antiestafilococo" y "un anticuerpo que se une a *estafilococo*" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse a un antígeno en *Staphylococcus aureus* ("*estafilococo*" o "*S. aureus*") con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico actuando de forma selectiva contra estafilococo. En una realización, el alcance de la unión de un anticuerpo antiestafilococo a una proteína no relacionada, proteína no de estafilococos menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a MRSA como se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a estafilococo tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 5 \text{ nM}$, $\leq 4 \text{ nM}$, $\leq 3 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menor, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En determinadas realizaciones, un anticuerpo antiestafilococo se une a un epítopo de estafilococo que se conserva entre estafilococos de diferentes especies.

La expresión "*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina" (MRSA), conocido de manera alternativa como *Staphylococcus aureus* resistente a múltiples fármacos o *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (ORSA, por sus siglas en inglés), se refiere a cualquier cepa de *Staphylococcus aureus* que es resistente a antibióticos betalactámicos, que incluyen las penicilinas (por ejemplo, meticilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, etc.) y las cefalosporinas. "*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina" (MSS por sus siglas en inglés) se refiere a cualquier cepa de *Staphylococcus aureus* que es sensible a los antibióticos betalactámicos.

La expresión "concentración inhibidora mínima" ("MIC, por sus siglas en inglés") se refiere a la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche. Se conocen ensayos para determinar la MIC. Un método es como se describe en el Ejemplo 18 a continuación.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca

- anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno de los mismos, (Miller et al (2003) J. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítomo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede ser reconocido y estar unido por más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunitariamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, incluyendo dichas dianas, pero sin limitación, célula o células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria, una célula infectada o un microorganismo tal como una bacteria. La inmunoglobulina (Ig) divulgada en el presente documento puede ser de cualquier isotipo excepto IgM (por ejemplo, IgG, IgE, IgD e IgA) y subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie. En un aspecto, la Ig es de origen humano, murino o de conejo. En una realización específica, la Ig es de origen humano.
- La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante que posee su cadena pesada. Hay cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden además dividirse en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.
- "Anticuerpos naturales" se refieren a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con diversas estructuras. Por ejemplo, los anticuerpos IgG naturales son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por enlaces disulfuro. Del extremo N al extremo C, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De manera análoga, del extremo N al extremo C, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio variable constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.
- Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo natural o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.
- Un "fragmento de unión a antígeno" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítomo, salvo por posibles variantes de anticuerpos, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, variación natural en la glucosilación), estando presentes dichas variantes generalmente en cantidades menores. Una de estas posibles variantes para los anticuerpos IgG1 es la escisión de la lisina (K) C-terminal de la región constante de cadena pesada. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen generalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales está dirigido contra un solo determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante diversas técnicas, incluyendo pero, sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los loci de inmunoglobulinas humanas, siendo descritos tales métodos y otros métodos a modo de ejemplo para hacer anticuerpos monoclonales en el presente documento. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos.
- La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente

o especie diferente.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o que deriva de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpo humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpo humanas. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda restos de unión a antígeno no humanos.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que la totalidad o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a aquellas de un anticuerpo no humano y la totalidad o sustancialmente todas las FR corresponden a aquellas de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano, se refiere a un anticuerpo que se ha sometido a humanización.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo natural tienen generalmente estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés) y tres regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés). (Véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007).) Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen a un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une al antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV" cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en su secuencia ("regiones determinantes de complementariedad" o "CDR") y/o forman bucles definidos estructuralmente y/o contienen los restos que entran en contacto con el antígeno ("contactos de antígeno"). En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis CDR, y se cree que H3 en particular desempeña un papel único en conferir una especificidad delicada a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (Hamers-Casterman et al., (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff et al., (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736).

Están en uso varias delimitaciones de HVR y se abarcan en el presente documento. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia and Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Para contactos de antígeno, consúltese MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996). Las HVR de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en la VH. A menos que se indique lo contrario, los restos de HVR, los restos de CDR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat et al., *supra*.

La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos

como en Kabat" y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., supra. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

"Marco" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de restos de la región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable consiste de cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR aparecen generalmente en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Un "marco aceptor humano", para los fines del presente documento, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano, como se define a continuación. Un marco aceptor humano "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o de un marco consenso humano pueden comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos es 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia marco de inmunoglobulina humana o a la secuencia marco conservada de consenso humana VL.

Un "marco de consenso humano" es un marco que representa los restos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias marco VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de las secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. En una realización, para la VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat et al., supra. En una realización, para la VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat et al., supra.

"Afinidad " se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo precursor que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

El término "epítipo" se refiere al sitio particular en una molécula de antígeno al que se une un anticuerpo.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" que un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo de competencia en un 50 % o más. En el presente documento, se proporciona un ensayo de competencia a modo de ejemplo.

Un "anticuerpo no marcado" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no marcado puede estar presente en una formulación farmacéutica.

La expresión "funciones efectoras" se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B; y activación de linfocitos B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en donde la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citotóxicos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan de manera específica a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente destruyan a la célula diana con

citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo Fcγ(gamma)RIII, mientras que los monocitos expresan Fcγ(gamma)RI, Fcγ(gamma)RII y Fcγ(gamma)RIII. La expresión Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como se describe en los documentos US 5.500.362 o US 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

"Fagocitosis" se refiere a un proceso por el cual un patógeno es engullido o internalizado por una célula hospedadora (por ejemplo, macrófago o neutrófilo). Los fagocitos median la fagocitosis por tres vías: (i) receptores directos de la superficie celular (por ejemplo, lectinas, integrinas y receptores eliminadores) (ii) complemento potenciado- usando receptores del complemento (incluyendo CRI, receptor para C3b, CR3 y CR4) para unir e ingerir patógenos opsonizados del complemento y (iii) anticuerpos potenciados, utilizando receptores Fc (incluidos FcγgammaRI, FcγgammaRIIA y FcγgammaRIIIA) para unir partículas opsonizadas de anticuerpos que después se internalizan y se fusionan con los lisosomas para convertirse en fagolisosomas. En la presente invención, se cree que la vía (iii) desempeña un papel importante en la administración de agentes terapéuticos AAC anti-MRSA a leucocitos infectados, por ejemplo, neutrófilos y macrófagos (Phagocytosis of Microbes: complexity in Action by D. Underhill and A. Ozinsky. (2002) *Annual Review of Immunology*, Vol 20:825).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina C-terminal (resto 447 según el sistema de numeración EU, también llamado índice EU, tal como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos de K447 eliminados, poblaciones sin restos de K447 eliminador y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin resto K447. La expresión "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto. Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994). Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie y Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6 (2004); documento WO 2004/92219 (Hinton et al.). La unión a FcRn *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión a alta afinidad de FcRn humano puede analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates a los que se administran los polipéptidos que tienen una región Fc variante. El documento WO 2004/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos que mejoran o disminuyen la unión a los FcR. Véase también, por ejemplo, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

El hidrato de carbono fijado a la región Fc puede alterarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden generalmente un oligosacárido biantenarico, ramificado que está fijado generalmente mediante un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. (1997) *TIBTECH* 15:26-32. El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa fijada a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, se pueden realizar modificaciones del oligosacárido en una IgG para preparar IgG con determinadas propiedades mejoradas adicionalmente. Por ejemplo, se proporcionan modificaciones de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa fijada (directa o indirectamente) a una región Fc. Dichas modificaciones pueden haber mejorado la función de ADCC. Véase, por ejemplo, el documento US 2003/0157108 (Presta, L.); el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Ejemplos de publicaciones relacionadas con modificaciones de anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; el documento WO2005/053742; el documento WO2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lee 13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et

al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y estirpes celulares desactivadas, tales como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO desactivadas (véanse, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Un "anticuerpo aislado" es uno que se ha separado de un componente de su entorno natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más de un 95 % o 99 % de pureza como se determina por, por ejemplo, medios electroforéticos (por ejemplo, SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico (IEF), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, intercambio iónico o HPLC de fase inversa). Para revisar los métodos de evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico incluido en células que normalmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente extracromosómicamente o en una ubicación cromosómica que es diferente a su ubicación cromosómica natural.

"Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-WTA beta" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, incluyendo dichas moléculas de ácido nucleico en un solo vector o vectores separados, y dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más ubicaciones de una célula hospedadora.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente a" o es "específico para" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, tales como la unión entre un diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia del diana en presencia de una población heterogénea de moléculas que incluyen moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a este diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de la que se une a otras dianas. En una realización, el grado de unión de un anticuerpo a un diana no relacionada con WTA-beta es menor que aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a la diana como se mide, por ejemplo, mediante radioinmunoensayo (RIA). En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente a WTA beta tiene una constante de disociación (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$ o $\leq 0,1 \text{ nM}$. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo que se conserva de diferentes especies. En otra realización, se puede incluir la unión específica, pero no requiere unión exclusiva.

"Afinidad de unión" se refiere generalmente a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañero Y puede estar representada en general por la constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. Se conoce diversos métodos de medición de la afinidad de unión en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones específicas ilustrativas y a modo de ejemplo para medir la afinidad de unión.

En una realización, la " K_d " o "valor K_d " de acuerdo con esta invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe mediante el siguiente ensayo. La afinidad de unión a la solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (DYNEX Technologies, Inc.) se recubren durante la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante de dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan antígeno [^{125}I] 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Después, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. A partir de entonces, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). La solución se retira después y la placa se lava ocho veces con tensioactivo TWEEN-20™ al 0,1 % en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 μl / pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

De acuerdo con otra realización, la K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizados en ~ 10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, se activan los chips de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/min para alcanzar aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de la proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo TWEEN 20™ al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (Programa informático de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, la constante de asociación puede determinarse utilizando una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

Una "constante de asociación", "tasa de asociación", "velocidad de asociación", o " k_{on} " de acuerdo con esta invención también se puede determinar como se describe anteriormente usando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora", y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refiere a células en las cuales se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula primaria transformada y la progenie derivada de esta independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula precursora, pero puede contener mutaciones. Se incluye en el presente documento la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica explorada o seleccionada en la célula transformada originalmente.

El término "vector", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. El término incluye el vector en forma de una estructura de ácido nucleico autorreplicante, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en donde se ha introducido. Determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están enlazados operativamente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión".

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" respecto de la secuencia de un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue programado por Genentech, Inc., y el código fuente, junto con la documentación para usuarios, se han depositado en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde está registrada con el n.º de Registro de Derechos de Autor de los Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., Sur de San Francisco, California o puede compilarse a partir de su código fuente. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencia se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones donde se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente: 100 veces la fracción X/Y , donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la

alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de A respecto de B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto de A. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe.

La expresión "antibiótico de tipo rifamicina" significa la clase o grupo de antibióticos que tienen la estructura de, o estructura similar a, rifamicina.

La expresión "antibiótico de tipo rifalazil" significa la clase o grupo de antibióticos que tienen la estructura de, o estructura similar a, rifalazil.

Cuando se indica el número de sustituyentes, la expresión "uno o más" se refiere al intervalo desde un sustituyente hasta el mayor número de sustitución posible, es decir, reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por los sustituyentes. El término "sustituyente" indica un átomo o un grupo de átomos que reemplaza un átomo de hidrógeno en la molécula precursora. El término "sustituido" indica que un grupo específico lleva uno o más sustituyentes. Cuando cualquier grupo pueda portar múltiples sustituyentes y se proporcione varios posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan de manera independiente y no necesitan ser los mismos. La expresión "no sustituido" significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. La expresión "opcionalmente sustituido" significa que el grupo especificado no está sustituido o está sustituido por uno o más sustituyentes, elegido independientemente del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, la expresión "uno o más" significa desde un sustituyente hasta el mayor número de sustitución posible, es decir, reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por los sustituyentes.

El término "alquilo" como se usa en el presente documento se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a doce átomos de carbono (C_1 - C_{12}), en donde el radical alquilo puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otra realización, un radical alquilo es de uno a ocho átomos de carbono (C_1 - C_8), o de uno a seis átomos de carbono (C_1 - C_6). Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimetil-2-butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$), 1-heptilo, 1-octilo y similares.

El término "alquileo", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarbonado divalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a doce átomos de carbono (C_1 - C_{12}), en donde el radical alquileo puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otra realización, un radical alquileo tiene de uno a ocho átomos de carbono (C_1 - C_8), o de uno a seis átomos de carbono (C_1 - C_6). Ejemplos de grupos alquileo incluyen, pero sin limitación, metileno ($-CH_2-$), etileno ($-CH_2CH_2-$), propileno ($-CH_2CH_2CH_2-$) y similares.

El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2 - C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp^2 carbono-carbono, en donde el radical alquenilo puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en el presente documento e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans" o, como alternativa, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etilenilo o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$) y similares.

El término "alquenileno" se refiere a un radical hidrocarbonado divalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2 - C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace sp^2 carbono-carbono, donde el radical alquenileno puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más de los sustituyentes descritos en el presente documento e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans" o, como alternativa, orientaciones "E" y "Z". Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etilenileno o vinileno ($-CH=CH-$), alilo ($-CH_2CH=CH-$) y similares.

El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarbonado monovalente lineal o ramificado de dos a ocho átomos de carbono (C_2 - C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono-carbono, en donde el radical alquinilo puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargilo, $-CH_2C\equiv CH$), y similares.

El término "alquinileno" se refiere a un radical hidrocarbonado divalente lineal o ramificado de dos a ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace sp carbono-carbono, en donde el radical alquinileno puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, etinileno ($-C\equiv C-$), propinileno (propargileno, $-CH_2C\equiv C-$), y similares.

Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "anillo carbocíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un anillo monovalente no aromático, saturado o parcialmente insaturado que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (C_3-C_{12}) como un anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como un anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos en el anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6], o como sistemas puente tal como biciclo [2.2.1] heptano, biciclo [2.2.2] octano y biciclo [3.2.2] nonano. También se incluyen restos espiro dentro del alcance de esta definición. Ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, cyclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares. Los grupos carbociclilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

"Ariilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (C_6-C_{20}) obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos ariilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Ariilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o a un anillo carbocíclico aromático. Los grupos ariilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno (por ejemplo, fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos ariilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

"Arileno" significa un radical hidrocarbonado aromático divalente de 6-20 átomos de carbono (C_6-C_{20}) obtenido por la eliminación de dos átomos de hidrógeno de dos átomos de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos arileno se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Arileno incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o a un anillo carbocíclico aromático. Los grupos arileno típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno (fenileno), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenileno, indenileno, indanileno, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arileno están opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a aproximadamente 20 átomos en el anillo en el que al menos un átomo en el anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, siendo el resto de los átomos en el anillo C, donde uno o más átomos en el anillo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros en el anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros en el anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; and J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales donde los radicales heterociclo están fusionados con un anillo saturado, parcialmente insaturado, o anillo carbocíclico o heterocíclico aromático. Ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación, morfolin-4-ilo, piperidin-1-ilo, piperazinilo, piperazina-4-il-2-ona, piperazina-4-il-3-ona, pirrolidin-1-ilo, tiomorfolin-4-ilo, S-dioxotiomorfolin-4-ilo, azocan-1-ilo, azetidin-1-ilo, octahidropirido[1,2-a] pirazin-2-ilo, [1,4] diazepan-1-ilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditiolanilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolil quinolizino y N-piridilureas. También se incluyen restos espiro dentro del alcance de esta definición. Ejemplos de un grupo heterocíclico en donde 2 átomos de carbono en el anillo están sustituidos con restos oxo ($=O$) son pirimidindionilo y 1,1-dioxotiomorfolinilo. Los grupos heterociclo del presente documento están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5, 6 o 7 miembros, e incluye sistemas de anillos fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-20 átomos, que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Ejemplos de grupos heteroarilo

son piridinilo (que incluye, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, indolilo, benzoimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo. Los grupos heteroarilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos a carbono (enlazado a carbono) o a nitrógeno (enlazado a nitrógeno) cuando sea posible. A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina, posición 2, 3, o 4 de una azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo y no de limitación, heterociclos o heteroarilos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfina y posición 9 de un carbazol o β -carbolina.

Un "metabolito" es un producto producido a través del metabolismo, en el cuerpo, de un compuesto específico o una sal del mismo. Los metabolitos de un compuesto pueden identificarse usando técnicas habituales conocidas en la técnica y se determinan sus actividades usando ensayos como los descritos en el presente documento. Dichos productos pueden ser el resultado, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos de compuestos de la invención, incluyendo los compuestos producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula I de la presente invención, con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que sea eficaz la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

Una formulación "estable" es aquella en donde la proteína en la misma conserva de forma esencial su estabilidad e integridad física y química tras el almacenamiento. Están disponibles en la técnica, diferentes técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para la exploración rápida, la formulación puede mantenerse a 40 °C durante 2 semanas a 1 mes, momento en el que se mide la estabilidad. Cuando la formulación debe almacenarse a 2-8 °C, generalmente la formulación debe ser estable a 30 °C o 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante al menos 2 años. Cuando la formulación se almacene a 30 °C, generalmente la formulación debe ser estable durante al menos 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento puede usarse como un indicador de la estabilidad de la proteína. Por lo tanto, una formulación "estable" puede ser aquella en donde menos del 10 % y preferentemente menos del 5 % de la proteína están presentes como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier aumento en la formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación "isotónica" es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica inferior a la de la sangre humana. De manera correspondiente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica superior a la de la sangre humana. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de presión de vapor o de congelación en hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Los "vehículos" tal como se usan en el presente documento incluyen vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa a pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina;

monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contra iones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

- 5 Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante. Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no son tóxicos a la concentración y la forma en que se formulan. Por ejemplo, ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen alquilos de cadena lineal y ramificada, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, mono, di y tricarboxílicos, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, propanodioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxibenzoico, ascórbico, cinámico, laurilsulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glucónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiocianico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbicio[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, 4,4'-metilenbis-3-
- 10
- 15
- 20 (ácido hidroxi-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

- Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no son tóxicas a la concentración y de la forma en que se formulan. Por ejemplo, bases adecuadas incluyen aquellas formadas a partir de metales que forman bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas que incluyen, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, [por ejemplo, $N(R')_4^+$ (donde R' es independientemente H o alquilo C_{1-4} , por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Son bases orgánicas no tóxicas particularmente preferidas isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitclohexilamina, colina y cafeína.
- 25
- 30

- Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales que se pueden usar con la presente invención incluyen aquellos derivados de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.
- 35

- Los tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellos derivados de las sales de adición tanto de ácido como de base de los ácidos y bases indicados anteriormente. Los tampones y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.
- 40

- Un "azúcar farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína durante el almacenamiento. Cuando la formulación se pretende liofilizar y después reconstituir, los "azúcares farmacéuticamente aceptables" también pueden conocerse como un "lioprotector". Azúcares a modo de ejemplo y sus correspondientes alcoholes de azúcar incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o de peso molecular superior, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; PLURONICS®; y combinaciones de los mismos. Lioprotectores adicionales a modo de ejemplo incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, isomaltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alcoholes de azúcar preferidos son los monoglucósidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glicosídico puede ser glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables preferidos son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Los azúcares farmacéuticamente aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad protectora" (por ejemplo, previo a la liofilización), lo que significa que la proteína esencialmente conserva su estabilidad e integridad física y química durante el almacenamiento (por ejemplo, después de la reconstitución y el almacenamiento).
- 45
- 50
- 55
- 60

- El "diluyente" de interés en el presente documento es aquel que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWI por sus siglas en inglés), solución a pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer y solución de dextrosa. En una realización
- 65

alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de usos múltiples (dosis múltiples). Ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio) en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

Un "individuo" o "sujeto" o "paciente" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tal como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, como "tratar" o "que trata") se refiere a la intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo, tejido o célula a tratar durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero sin limitación, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar la patología y remisión o pronóstico mejorado, todo medible por un experto en la materia, como un médico. En una realización, el tratamiento puede significar alivio de los síntomas, disminución de cualesquiera consecuencias patológicas directas o indirectas de la enfermedad, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad infecciosa, mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para frenar la progresión de una enfermedad infecciosa.

Tal como se usa en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

El término "fagosoma" se refiere a un depósito endocítico cerrado por una membrana internalizada de una célula fagocítica. Puede ser iniciado por fagocitosis directa, potenciada por anticuerpos o complemento. El término "fagolisosoma" se refiere a un depósito celular internalizado que se ha fusionado con uno o más lisosomas.

Las bacterias se dividen tradicionalmente en dos grupos principales, Gram positivas (Gm +) y Gram negativas (Gm-), basándose en su retención de la tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas están limitadas por una membrana lipídica de una sola unidad y, generalmente, contienen una capa gruesa (20-80 nm) de peptidoglicano responsable de retener la tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Por el contrario, las bacterias Gram negativas no pueden retener la tinción de cristal violeta, en su lugar, captan la contratinción (safranina o fucsina) y que aparece de color rojo o rosa. Las paredes celulares Gram positivas generalmente carecen de la membrana externa que se encuentra en las bacterias Gram negativas.

El término "bacteriemia" se refiere a la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo que se detecta con mayor frecuencia a través de un cultivo de sangre. Las bacterias pueden ingresar al torrente sanguíneo como una complicación grave de las infecciones (como neumonía o meningitis), durante la cirugía (especialmente cuando implica membranas mucosas como el tracto gastrointestinal), o debido a catéteres y otros cuerpos extraños que ingresan a las arterias o venas. La bacteriemia puede tener varias consecuencias. La respuesta inmunitaria a la bacteria puede causar sepsis y shock séptico, que tiene una tasa de mortalidad relativamente alta. Las bacterias también pueden usar la sangre para propagarse a otras partes del cuerpo, causando infecciones lejos del sitio original de infección. Los ejemplos incluyen endocarditis u osteomielitis.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la concentración mínima necesaria para lograr una mejora medible de un trastorno particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz, en el presente documento, puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo y peso del paciente y de la capacidad del anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para reducir la bacteriemia en una infección *in vivo*. En un aspecto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la cantidad eficaz para reducir la carga bacteriana o las unidades formadoras de colonias (UFC) aisladas de una muestra de paciente, tal como sangre, en al menos uno en escala logarítmica con respecto a antes de la administración del fármaco. En un aspecto más específico, la reducción es de al menos 2 en escala logarítmica. En otro aspecto, la reducción es de 3, 4, 5 en escala logarítmica. En otro aspecto más, la reducción es inferior a niveles detectables. En otra realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad de un AAC en una o más dosis administradas durante el curso del período de tratamiento, que logra un hemocultivo negativo (es decir, no permite el crecimiento de la bacteria que es la diana del AAC) en comparación con el hemocultivo positivo antes o al comienzo del

tratamiento del paciente infectado.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de, en la etapa temprana de la enfermedad, o incluso antes de la exposición a condiciones en las que el riesgo de infección es elevado, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, una cantidad profilácticamente eficaz es al menos una cantidad eficaz para reducir, prevenir la aparición de o la propagación de la infección de una célula a otra.

La administración "crónica" se refiere a la administración de uno o más medicamentos en un modo continuo en oposición a un modo de corta duración, a fin de mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza de manera consecutiva sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

El término "prospecto" se usa para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia combinada, las contraindicaciones y/o las advertencias en referencia al uso de dichos productos terapéuticos.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición al compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero se diferencian con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse mediante procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

"Enantiómeros" se refiere a estereoisómeros de un compuesto que no son imágenes especulares superponibles entre sí.

Las convenciones y definiciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen generalmente a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Muchos de los compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula en torno a su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el sentido de rotación del plano de luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo por que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico puede denominarse también enantiómero y una mezcla de dichos isómeros se denomina con frecuencia una mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede aparecer cuando no ha habido estereoselección ni estereoespecificidad en un proceso o reacción química. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

La expresión "grupo protector" se refiere a un sustituyente que se emplea habitualmente para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras que reaccionan otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente fijado a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad amino en el compuesto. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen, pero sin limitación, acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véanse T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991, o una edición posterior.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a dicho valor o parámetro en sí.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una/o", y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, en referencia a un "anticuerpo" es una referencia a de uno a muchos anticuerpos, tales como cantidades molares, e incluye equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia y así sucesivamente.

III. COMPOSICIONES Y MÉTODOS

CONJUGADOS ANTICUERPO-ANTIBIÓTICO (AAC)

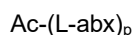
Los compuestos AAC de la invención incluyen aquellos con actividad antibacteriana, eficaz contra varios patógenos Gram positivos, Gram negativos, humanos y veterinarios, incluyendo los estafilococos. En una realización a modo de ejemplo, los compuestos AAC incluyen un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína conjugado, es decir, fijado covalentemente por un enlazador, a un resto antibiótico de tipo rifamicina. La actividad biológica del resto antibiótico de tipo rifamicina se modula por conjugación con un anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) de la invención suministran de manera selectiva una dosis eficaz de un agente antibacteriano a un sitio de infección de modo que se puede lograr mayor selectividad, es decir, una dosis eficaz más baja, mientras se aumenta el índice terapéutico ("ventana terapéutica").

La invención proporciona una nueva terapia antibacteriana que tiene como finalidad evitar la fuga de antibióticos al actuar de forma selectiva en poblaciones de bacterias que evaden la terapia antibiótica convencional. La novedosa terapia antibacteriana se logra con un Conjugado Anticuerpo Antibiótico (AAC) en el que un anticuerpo específico para los componentes de la pared celular en *S. aureus* (incluyendo MRSA) está químicamente enlazado a un antibiótico potente (un derivado de rifamicina). El antibiótico se combina con el anticuerpo a través de un enlazador peptídico escindible por proteasas diseñado para ser escindido por cathepsina B, una proteasa lisosómica que se encuentra en la mayoría de los tipos de células de mamíferos (Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13:855-869). El AAC actúa como un profármaco en el sentido de que el antibiótico está inactivo (debido al gran tamaño del anticuerpo) hasta que el enlazador se escinde. Debido a que las células hospedadoras captan una proporción significativa de *S. aureus* encontrado en una infección, principalmente neutrófilos y macrófagos, en algún momento durante el curso de la infección en el hospedador, y a que el tiempo pasado dentro de las células hospedadoras proporciona una oportunidad significativa para que la bacteria evada la actividad antibiótica. Los AAC de la invención están diseñados para unirse a *S. aureus* y liberar el antibiótico dentro del fagolisosoma después de que las células hospedadoras capten las bacterias. Por este mecanismo, los AAC pueden concentrar el antibiótico activo específicamente en un lugar donde *S. aureus* está escasamente tratado con antibióticos convencionales. Si bien la invención no está limitada o definida por un mecanismo de acción particular, los AAC mejoran la actividad antibiótica a través de tres posibles mecanismos: (1) El AAC suministra antibióticos dentro de las células de mamíferos que captan las bacterias, aumentando así la potencia de los antibióticos que se difunden de forma escasa en los fagolisosomas donde están secuestradas las bacterias. (2) Los AAC opsonizan las bacterias, aumentando así la captación de bacterias libres por las células fagocíticas, y liberan el antibiótico localmente para destruir las bacterias mientras están secuestradas en el fagolisosoma. (3) Los AAC mejoran la semivida de los antibióticos *in vivo* (farmacocinética mejorada) al enlazar el antibiótico a un anticuerpo. La farmacocinética mejorada de AAC permite el suministro de antibióticos suficiente en regiones donde está concentrado *S. aureus* mientras limita la dosis total de antibiótico que se necesita administrar por vía sistémica. Esta propiedad debería permitir la terapia a largo plazo con AAC para actuar de forma selectiva contra la infección persistente con efectos secundarios mínimos de los antibióticos.

La presente solicitud describe la generación de nuevos agentes terapéuticos de anticuerpos anti-WTA conjugados y su uso en el tratamiento de infecciones con bacterias Gram positivas (Gm+) incluyendo infecciones por *S. aureus*. Estos anticuerpos son capaces de actuar de forma selectiva en poblaciones de bacterias Gm+ que evaden la terapia antibiótica convencional.

Un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención comprende un anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared beta (WTA beta) fijado covalentemente por un enlazador peptídico a un antibiótico de tipo rifamicina.

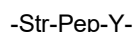
En un ejemplo, el conjugado anticuerpo-antibiótico tiene la fórmula:



en donde:

Ac es el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared;

L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:



donde Str es una unidad extensora; Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora;

abx es el antibiótico de tipo rifamicina; y

p es un número entero de 1 a 8.

El número de restos antibióticos que pueden conjugarse mediante un resto reactivo del enlazador a una molécula de anticuerpo puede estar limitado por el número de restos de cisteína libres, que se introducen por los métodos descritos en el presente documento. Los AAC a modo de ejemplo de Fórmula I, por lo tanto, comprenden anticuerpos que tienen 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de cisteína modificados por ingeniería (Lyon, R. et al (2012) Methods in Enzym. 502:123-138).

ANTICUERPOS ANTITEICOICOS DE PARED (WTA)

En el presente documento se divulgan determinados Ac anti-WTA y anticuerpos anti-WTA conjugados que se unen a WTA expresados en varias bacterias Gm+, incluyendo *Staphylococcus aureus*. Los anticuerpos anti-WTA pueden seleccionarse y producirse mediante los métodos enseñados en el documento US 8283294; Meijer PJ et al (2006) J Mol Biol. 358(3):764-72; Lantto J, et al (2011) J Virol. 85(4):1820-33, y en el Ejemplo 21 a continuación. La invención proporciona composiciones de estos Ac anti-WTA.

La pared celular de las bacterias Gram positivas comprende una capa gruesa de vainas de peptidoglicano (PGN) múltiple que no solo estabilizan la membrana celular sino que también proporcionan muchos sitios a los que se podrían fijar otras moléculas (Figura 3). Una clase importante de estas glicoproteínas de la superficie celular son los ácidos teicoicos ("TA, por sus siglas en inglés"), que son moléculas ricas en fosfato que se encuentran en muchas proteínas de unión a glicanos (GPB, por sus siglas en inglés). Los TA entran en dos tipos: (1) Los ácidos lipoteicoicos ("LTA"), que están anclados a la membrana plasmática y se extienden desde la superficie celular hasta la capa de peptidoglicano; y (2) los TA de pared (WTA), que están fijados covalentemente al peptidoglicano y se extienden a través y más allá de la pared celular (Figura 3). El WTA puede representar hasta el 60 % de la masa total de la pared celular en GPB. Como resultado, presenta un antígeno de superficie celular altamente expresado.

Las estructuras químicas de los WTA varían entre los organismos. En *S. aureus*, WTA está covalentemente enlazado al 6-OH del ácido N-acetil-murámico (MurNAc) a través de un disacárido compuesto de N-acetilglucosamina (GlcNAc)-1-P y N-acetil-manosamina (ManNAc), que está seguido por aproximadamente dos o tres unidades de glicerol fosfato (Figura 4). El polímero WTA real se compone entonces de aproximadamente 11-40 unidades de repetición de ribitol fosfato (Rbo-P). La síntesis gradual de WTA se inicia primero por la enzima llamada TagO y las cepas de *S. aureus* que carecen del gen TagO (por eliminación del gen) no producen ningún WTA. Las unidades de repetición pueden adaptarse adicionalmente con D-alanina (D-Ala) en C2-OH y/o con N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4-OH a través de enlaces glucosídicos α -(alfa) o β -(beta). Dependiendo de la cepa de *S. aureus* o de la fase de crecimiento de la bacteria, los enlaces glucosídicos podrían ser α -, β -, o una mezcla de los dos anómeros. Estas modificaciones de los azúcares con GlcNAc se adaptan mediante dos glicosiltransferasas (Gtfs) específicas derivadas de *S. aureus*: Gtf TarM media enlaces α -glicosídicos, mientras que Gtf TarS media enlaces β -(beta) glicosídicos.

Dada la evidencia significativa de que las reservas intracelulares de MRSA están protegidas de los antibióticos, las nuevas composiciones terapéuticas de la invención se desarrollaron para prevenir este método de evasión de antibióticos mediante el uso de un anticuerpo específico de *S. aureus* para unir un antibiótico a la bacteria, de modo que cuando la célula hospedadora engulle o internaliza la bacteria *in vivo*, lleva el antibiótico al interior de la célula hospedadora.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-WTA que son anti-WTA α o anti-WTA β . En otro aspecto, la invención proporciona Ac anti-*Staphylococcus aureus*. Los Ac a modo de ejemplo se clonaron a partir de linfocitos B de pacientes infectados con *S. aureus* (como se enseña en el Ejemplo 21). En una realización, los Ac anti-WTA y anti-*Staphylococcus aureus* son anticuerpos monoclonales humanos. La invención abarca Ac quiméricos y Ac humanizados que comprenden las CDR de los Ac de WTA actuales.

Para uso terapéutico, los Ac de WTA de la invención para la conjugación con antibióticos para generar AAC, pueden ser de cualquier isotipo excepto IgM. En una realización, los Ac de WTA son del isotipo IgG humano. En realizaciones más específicas, los Ac de WTA son IgG1 humana.

Las Figuras 6A y 6B enumeran los Ac que son anti-WTA α o anti-WTA β . A lo largo de la memoria descriptiva y las figuras, los Ac designados por un número de 4 dígitos (por ejemplo, 4497) también pueden denominarse con una "S" anterior, por ejemplo, S4497; ambos nombres se refieren al mismo anticuerpo que es la secuencia no modificada de tipo silvestre (WT) del anticuerpo. Las variantes del anticuerpo se indican mediante una "v" después del número de anticuerpo, por ejemplo, 4497.v8. A menos que se especifique (por ejemplo, por un número de variante), las secuencias de aminoácidos que se muestran son las secuencias originales, no modificadas/no alteradas. Estos Ac pueden alterarse en uno o más restos, por ejemplo para mejorar la pK, estabilidad, expresión, capacidad de fabricación (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos a continuación), mientras se mantiene sustancialmente aproximadamente la misma o mejor afinidad de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo de tipo silvestre, no modificado. La invención abarca las variantes de los presentes anticuerpos de WTA que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos. A continuación, a menos que se especifique de otra manera, la numeración de CDR está de acuerdo con Kabat y la numeración de dominio Constante está de acuerdo con la numeración EU.

La Figura 13A y la Figura 13B proporcionan la alineación de la secuencia de aminoácidos de las regiones Variables de cadena Ligera (VL) y la región Variable de cadena Pesada (VH), respectivamente de cuatro anticuerpos humanos anti-WTA alfa. Las secuencias CDR, CDR L1, L2, L3 y CDR H1, H2, H3 de acuerdo con la numeración de Kabat, están subrayadas.

5

Tablas 6A: Secuencias CDR de cadena Ligera del anti-WTA α .

Anticuerpo	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4461	KSSQSVLSRANNNYYVA (SEQ ID NO: 1)	WASTREF (SEQ ID NO: 2)	QQYYTSRRT (SEQ ID NO: 3)
4624	RSNQNLSSSSNNNYLA (SEQ ID NO: 7)	WASTRES (SEQ ID NO: 8)	QQYYANPRT (SEQ ID NO: 9)
4399	KSNQNVLASSNDKNYLA (SEQ ID NO: 13)	WASIRES (SEQ ID NO: 14)	QQYYTNPRT (SEQ ID NO: 15)
6267	KSSQNVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO: 19)	WASTRES (SEQ ID NO: 20)	QQYYTSPPYT (SEQ ID NO: 21)

Tablas 6B: Secuencias CDR de cadena Pesada del anti-WTA α .

Anticuerpo	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4461	DYYMH (SEQ ID NO: 4)	WINPKSGGTNYAQRFGG (SEQ ID NO: 5)	DCGSGGLRDF (SEQ ID NO: 6)
4624	DYYIH (SEQ ID NO: 10)	WINPNTGGTYAQQFRD (SEQ ID NO: 11)	DCGRGGLRDI (SEQ ID NO: 12)
4399	DYYIH (SEQ ID NO: 16)	WINPNTGGTNYAQQFQG (SEQ ID NO: 17)	DCGNAGLRDI (SEQ ID NO: 18)
6267	SYWIG (SEQ ID NO: 22)	IIHPGDSKTRYSPSFQG (SEQ ID NO: 23)	LYCSGGSCYSDR AFSSLGAGGYYY YGMGV (SEQ ID NO: 24)

10

Las secuencias de cada par de VL y VH son las siguientes:

Región Variable de la Cadena Ligera de 4461

15 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSRANNNYYVAWYQHKPGQPPKLLIYWASTREFGVPDRFSGSGSGT DFTLTINSLQAEDVAVYYCQQYYTSRRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)

Región Variable de Cadena Pesada de 4461

20 QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSKASGYSTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPKSGGTNYAQRFGQGRVTMT GDTSSIAAYMDLASLTSDDTAVYYCVKDCGSGGLRDFWGGQTTVTSS (SEQ ID NO: 26)

Región Variable de la Cadena Ligera de 4624

25 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCRSNQNLSSSSNNNYLAWYQQKPGQPLKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT DF TLTISSLQAEDVAVYYCQQYYANPRTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)

Región Variable de Cadena Pesada de 4624

30 QVQLQQSRVEVKRPGTSVKVSKTSGYTFSDYYIHWVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTYAQQFRDRVTMTRD TSIATAYLEMSSLTSDDTAVYYCAKDCGRGGLRDIWGPPTMTVTSS (SEQ ID NO: 28)

Región Variable de la Cadena Ligera de 4399

35 EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQNVLASSNDKNYLAWFQHKPGQPLKLUYWASIRESGVPDRFSGSGSGTD F TLTISSLRAEDVAVYYCQQYYTNPRTFGQGTKVEFN (SEQ ID NO: 29)

Región Variable de Cadena Pesada de 4399

EVQLVQSGAEVKKPGTSTVKVSKASGYTFTDYYIHVVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTNYAQKFQGRVTMTRD
TSIATAYMELSSLTSDDTAVYYCAKDCGNAGLRDIWGGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 30)

Región Variable de la Cadena Ligera de 6267

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLUIYWASTRESGVPDRFSGSGSGT
DFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYTSPPYTFGQGTKLEIE (SEQ ID NO: 31)

Región Variable de la Cadena Pesada de 6267

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIHPGDSKTRYSPSFQGGQVTISADK
SISTAYLQWNSLKASDTAMYYCARLYCSGGSCYSDRAFSSLGAGGYYYGGMGWGGQTTVTVSS (SEQ ID
NO: 32).

Se proporcionan ejemplos de un anticuerpo monoclonal aislado que se une al ácido teicoico de pared (WTA) que comprende una cadena ligera y una cadena H, comprendiendo, la cadena L, CDR L1, L2, L3 y comprendiendo la cadena H, CDR H1, H2, H3 en donde la CDR L1, L2, L3 y H1, H2, H3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR de cada uno de los Ac 4461 (SEQ ID NO: 1-6), 4624 (SEQ ID NO: 7-12), 4399 (SEQ ID NO: 13-18) y 6267 (SEQ ID NO: 19-24) respectivamente, como se muestra en la Tabla 6A y 6B.

En otros ejemplos, el Ac monoclonal aislado que se une a WTA comprende una región variable de cadena H (VH) y una región variable de cadena L (VL), en donde la VH comprende al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de la secuencia de la región VH de cada uno de los anticuerpos 4461, 4624, 4399 y 6267, respectivamente. En otro aspecto específico más, la identidad de secuencia es del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

También se describen Ac anti-WTA beta que comprenden las secuencias CDR de la cadena L y H como se muestra en la Figura 14. En una realización, los Ac monoclonales anti-WTA beta aislados comprenden la CDR L1, L2, L3 y H1, H2, H3 seleccionadas del grupo que consiste en las CDR de cada uno de los 13 Ac en la Figura 14. En otra realización, la invención proporciona unos Ac anti-WTA beta aislados que comprenden al menos un 95 % de identidad de secuencia a lo largo de los dominios de la región V de cada uno de los 13 anticuerpos. En otro aspecto específico más, la identidad de secuencia es del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

De los 13 Ac anti-WTA beta, 6078 y 4497 se modificaron para crear variantes i) que tienen una Cys modificada por ingeniería en una o ambas cadenas L y H para la conjugación a los productos intermedios enlazador-antibiótico; y ii) en donde el primer resto, en la cadena H, Q se altera a E (v2) o los dos primeros restos QM se cambian a EI o EV (v3 y v4).

Las Figuras 15A-1 y 15A-2 proporcionan la secuencia de aminoácidos de la cadena L de longitud completa del Ac anti-WTA beta 6078 (sin modificar) y sus variantes, v2, v3, v4. Las variantes de la cadena L que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 205 en este caso). La designación variante, por ejemplo, v2LC-Cys significa la variante 2 que contiene una Cys modificada por ingeniería en la cadena L. HCLC-Cys significa que las cadenas H y L del anticuerpo contienen un Cys diseñado. Las Figuras 15B-1 a 15B-4 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa del Ac anti-WTA beta 6078 (sin modificar) y sus variantes, v2, v3, v4 que tienen cambios en el primer o los 2 primeros restos de la cadena H. Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 118).

Región Variable de Cadena Ligera (VL) de 6078

DIVMTQSPSILSASVGDRTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL
LQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 111)

Región Variable de Cadena Pesada (VH) de 6078

XX₁QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQKFQGRVTLT
GDTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID NO: 112)
en donde X es Q o E; y X₁ es M, I o V.

Cadena ligera de 6078

DIVMTQSPSILSASVGDRTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL
LQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 113)

Cadena Ligera modificada por ingeniería con Cisteína de 6078

5 DIVMTQSPSILSASVGDRTITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTSS
LQPDDFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 115)

Cadena Pesada de Longitud Completa de 6078 WT (de tipo silvestre)

10 QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQKFQGRVTLT
GDTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
15 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG (SEQ ID NO: 114)

Cadena Pesada de Longitud Completa de variantes de 6078 (v2, v3 o v4)

20 EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQKFQGRVTLTG
DTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
25 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO: 116) en donde X puede ser M, I o V.

Cadena Pesada modificada por ingeniería con Cys de variantes de 6078 (v2, v3 o v4)

30 EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQKFQGRVTLTG
DTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
35 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFY

PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG (SEQ ID NO: 117)

40 en donde X es M, I o V.

También se describe un anticuerpo anti-WTA beta aislado que comprende una cadena pesada y una ligera, en donde la cadena pesada comprende una VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 112. En una realización adicional, este anticuerpo comprende además, una VL que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 111. En un ejemplo, el anticuerpo anti-WTA beta comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena L comprende una VL de SEQ ID NO: 111 y la cadena H comprende una VH de SEQ ID NO: 112. En un ejemplo aún más específico, el anticuerpo anti-WTA beta aislado comprende una cadena L de SEQ ID NO: 113 y una cadena H de SEQ ID NO: 114.

50 Las variantes de cadena H y L de anti-WTA beta modificadas por ingeniería con Cys de 6078 pueden emparejarse en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ac completos para conjugarse con productos intermedios enlazador-Abx para generar los AAC anti-WTA de la invención. La cadena L no modificada (SEQ ID NO: 113) se puede emparejar con una variante de cadena H modificada por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 117; la variante puede ser una en donde X es M, I o V. La cadena L modificada por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 115 se puede
55 emparejar con: la cadena H de SEQ ID NO: 114; una variante de cadena H de SEQ ID NO: 116; o una variante de cadena H modificada por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 117 (en esta versión, tanto las cadenas H como L están modificadas por ingeniería con Cys). En un ejemplo particular, el anticuerpo anti-WTA beta y el AAC anti-WTA beta de la invención comprenden una cadena L de SEQ ID NO: 115 y cadena H de SEQ ID NO: 116.

60 Las Figuras 16A-1 y 16A-2 proporcionan la cadena L de longitud completa de del Ac anti-WTA beta 4497 (sin modificar) y sus variantes v8. Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 205). Las Figuras 16B-1, 16B-2, 16B-3 muestran una alineación de la cadena H de longitud completa del Ac anti-WTA beta 4497 (sin modificar) y su variante v8 con D alterada a E en la posición 96 de CDR H3, con o sin la Cys modificada por
65 ingeniería. Las variantes de la cadena H que contienen una Cys modificada por ingeniería se indican mediante la C en el cuadro negro al final de la región constante (en el resto EU n.º 118 en este caso). La CDR H3 no modificada es

GDGGLDD (SEQ ID NO: 104); CDR H3 de 4497v8 es GEGGLDD (SEQ ID NO: 118).

Región Variable de la Cadena Ligera de 4497

5 DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVPDRFSGSGFGT
DF TLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 119)

Región Variable de Cadena Pesada de 4497

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADSVRGRFIISRDN
A KNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGDGGLDDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 120)

Región variable de Cadena Pesada de 4497.v8

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADSVRGRFIISRDN
AKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 156)

Cadena ligera de 4497

20 DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVPDRFSGSGFGT
DFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 121)

25 Cadena Pesada de 4497.v8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADSVRGRFIISRDN
AKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
30 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 122)

35 Cadena Ligera de 4497-Cys

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVPDRFSGSGFGT
DFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
40 NO: 123)

Cadena Pesada de 4497.v8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADSVRGRFIISRDN
AKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
45 TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
50 (SEQ ID NO: 157; la misma que SEQ ID NO: 122).

Cadena Pesada de 4497.v8-Cys

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADSVRGRFIISRDN
AKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTWNSGALTSKVHTFPFAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSV

60 LTVLFIQDWLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO: 124)

65 Otro anticuerpo anti-WTA beta aislado proporcionado por la invención comprende una cadena pesada y una ligera,
en donde la cadena pesada comprende una VH que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ
ID NO: 120. En una realización adicional, este anticuerpo comprende además, una VL que tiene al menos un 95 %

de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 119. En una realización específica, el anticuerpo anti-WTA beta comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en donde la cadena L comprende una VL de SEQ ID NO: 119 y la cadena H comprende una VH de SEQ ID NO: 120. En un ejemplo aún más específico, el anticuerpo anti-WTA beta aislado comprende una cadena L de SEQ ID NO: 121 y una cadena H de SEQ ID NO: 122.

Las variantes de cadena H y L de anti-WTA beta modificadas por ingeniería con Cys de 4497 pueden emparejarse en cualquiera de las siguientes combinaciones para formar Ac completos para conjugarse con productos intermedios enlazador-Abx para generar los AAC anti-WTA de la invención. La cadena L no modificada (SEQ ID NO: 121) se puede emparejar con una variante de cadena H modificadas por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 124. La cadena L modificada por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 123 se puede emparejar con: la variante de la cadena H de SEQ ID NO: 157; o una variante de cadena H modificada por ingeniería con Cys de SEQ ID NO: 124 (en esta versión, tanto las cadenas H como L están modificadas por ingeniería con Cys). En una realización particular, el anticuerpo anti-WTA beta y el AAC anti-WTA beta de la invención comprenden una cadena L de SEQ ID NO: 123.

Otro ejemplo más es un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cada uno de los Ac anti-WTA alfa de la Figura 13A y la Figura 13B. También se proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cada uno de los Ac anti-WTA beta de la Figura 14, Figuras 15 A y 15 B, y Figuras 16 A y 16 B.

La unión de los anticuerpos anti-WTA a WTA está influenciada por la orientación anomérica de las modificaciones de los azúcares con GlcNAc en WTA. Los WTA se modifican mediante modificaciones de azúcares con N-acetilglucosamina (GlcNAc) en la posición C4-OH mediante enlaces glucosídicos α o β , por glicosiltransferasa TarM o glicosiltransferasa TarS, respectivamente. Por consiguiente, preparaciones de la pared celular a partir de cepas mutantes de glicosiltransferasa que carecen de TarM (Δ TarM), TarS (Δ TarS), o tanto TarM como TarS (Δ TarM/ Δ TarS) se sometieron a análisis de inmunotransferencia con anticuerpos contra WTA. El anticuerpo WTA (S7574) específico para modificaciones de α -GlcNAc en WTA no se une a la preparación de la pared celular a partir de la cepa Δ TarM. Por el contrario, un anticuerpo WTA (S4462) específico para modificaciones de β -GlcNAc en WTA no se une a la preparación de la pared celular de la cepa Δ TarS. Como cabía esperar, estos dos anticuerpos no se unen a las preparaciones de la pared celular de una cepa de eliminación que carece de ambas glicosiltransferasas (Δ TarM/ Δ TarS) y tampoco la cepa que carece de cualquier WTA (Δ TagO). De acuerdo con dicho análisis, los anticuerpos se han caracterizado como Acm anti- α -GlcNAc WTA, o como Acm anti- β -GlcNAc WTA como se enumeran en la Tabla en las Figuras 6A y 6B.

Los aminoácidos de cisteína se pueden modificar por ingeniería en sitios reactivos en un anticuerpo y que no formen enlaces disulfuro intracadena o intermoleculares (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dorman et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52). Los tioles de las cisteínas modificadas por ingeniería pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los productos intermedios enlazador-antibiótico de la presente invención que tienen grupos reactivos con tiol, electrófilos tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar AAC con anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína (tioMab) y los restos antibióticos (abx). La ubicación del resto antibiótico puede así diseñarse, controlarse y conocerse. La carga antibiótica se puede controlar ya que los grupos tiol de las cisteínas modificadas por ingeniería reaccionan generalmente con reactivos enlazadores reactivos con tiol o productos intermedios enlazador-antibiótico con alto rendimiento. Modificar por ingeniería un anticuerpo anti-WTA para introducir un aminoácido cisteína por sustitución en un solo sitio en la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo tetramero simétrico. Se puede lograr una carga antibiótica cercana a 2 y una homogeneidad cercana del producto de conjugación AAC.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos anti-WTA modificados por ingeniería con cisteína, por ejemplo, "tioMab", donde uno o más restos de la molécula se sustituyen por restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Mediante la sustitución de esos restos con cisteína, los grupos tiol reactivos se colocan, así, en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos antibióticos o restos enlazador-antibiótico, para crear un inmunoconjugado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En determinadas realizaciones, pueden sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos por cisteína, incluyendo V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de la cadena pesada. Se muestran mutantes a modo de ejemplo, no limitantes, de cadena pesada A118C (SEQ ID NO: 149) y de cadena ligera V205C (SEQ ID NO: 151) modificados por ingeniería con cisteína de un anticuerpo anti-WTA. Los anticuerpos anti-WTA modificadas por ingeniería con cisteína pueden generarse como se describe (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; documento US 7521541; documento US-2011/030133A).

En otro ejemplo, la invención se refiere a un anticuerpo anti-WTA aislado que comprende una cadena pesada y una ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia de región constante de cadena pesada de tipo silvestre o una mutante modificada por ingeniería con cisteína (TioMab) y la cadena ligera comprende una secuencia de región constante de cadena ligera de tipo silvestre o una mutante modificada por ingeniería con cisteína (TioMab). En un aspecto, la cadena pesada tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con:

Región constante de cadena pesada (IgG1), tipo silvestre (SEQ ID NO: 148)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

5

(SEQ ID NO: 148)

10 Región constante de cadena pesada (IgG1), A118C "TioMab"

CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 149)

15

y la cadena ligera tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con:

Región constante de cadena ligera (kappa), tipo silvestre

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

20

(SEQ ID NO: 150)

Región constante de cadena ligera (kappa), V205C "TioMab"

25

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
EC

(SEQ ID NO: 151)

30 Los AAC de la invención incluyen anticuerpos anti-WTA modificados por ingeniería con cisteína en los que uno o más aminoácidos de un anticuerpo anti-WTA de tipo silvestre o precursor están reemplazados con un aminoácido cisteína. Cualquier forma de anticuerpo puede modificarse por ingeniería de esta manera, es decir, mutarse. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab precursor puede modificarse por ingeniería para formar un Fab modificado por ingeniería con cisteína, denominado, en el presente documento, "TioFab". De manera análoga, un anticuerpo monoclonal precursor puede modificarse por ingeniería para formar un "TioMab". Cabe señalar que una mutación puntual produce un solo resto de cisteína modificado por ingeniería en un TioFab, mientras que una mutación puntual produce dos restos de cisteína diseñados en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los mutantes con restos de cisteína (Cys) reemplazados ("modificados por ingeniería") se evalúan para determinar la reactividad de los grupos tiol de cisteínas modificadas por ingeniería recién introducidas.

40

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden producirse usando células hospedadoras en cultivo. Las células hospedadoras pueden transformarse con vectores (vectores de expresión o clonación) que comprenden uno o más ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento. Las células pueden

cultivarse en condiciones adecuadas para producir los anticuerpos y los anticuerpos producidos por la célula pueden purificarse adicionalmente. Las células adecuadas para producir anticuerpos pueden incluir células procariotas, de levadura o eucariotas superiores (por ejemplo, de mamíferos). En algunas realizaciones, se usa una célula de mamífero (una célula de mamífero humano o no humano). En algunas realizaciones, se utiliza una célula de ovario de hámster chino (CHO).

Las células de mamífero se pueden cultivar y la propagación de células de mamífero en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares de mamíferos hospedadoras pueden incluir, sin limitación, línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humanas (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MCR 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas celulares de mamíferos hospedadoras útiles incluyen líneas celulares de mieloma tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas celulares de mamífero hospedadoras adecuadas para la producción de anticuerpos, véanse, por ejemplo, Yazaki y Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), páginas. 255-268.

También se pueden utilizar cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunias, tomate, lenteja de agua (Leninaceae), alfalfa (*M. truncatula*) y tabaco como hospedadoras.

Las células procariotas adecuadas para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilos* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p.ej *B. licheniformis* 41P divulgado en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

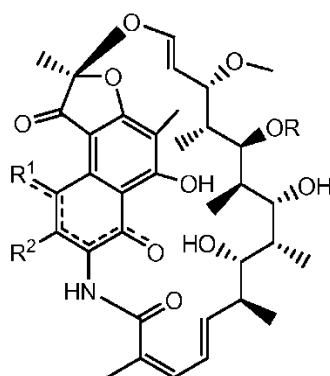
Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más utilizado habitualmente entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, varios géneros, especies y cepas diferentes están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (Documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (Documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

RESTOS ANTIBIÓTICOS DE TIPO RIFAMICINA

El resto antibiótico (abx) de los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) de la invención es un antibiótico de tipo rifamicina o un grupo que tiene un efecto citotóxico o citostático. Las rifamicinas son un grupo de antibióticos que la bacteria obtiene de forma natural, *Nocardia mediterranei*, *Amycolatopsis mediterranei* o artificial. Son una subclase de la familia Ansamicina más grande que inhibe la ARN polimerasa bacteriana (Fujii et al (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:1489-1492; Feklistov, et al (2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105(39): 14820-5) y tienen potencia contra bacterias gram positivas y gram negativas selectivas. Las rifamicinas son particularmente eficaces contra las micobacterias y, por lo tanto, se usan para tratar la tuberculosis, lepra e infecciones por el complejo de mycobacterium avium (MAC, por sus siglas en inglés). El grupo de tipo rifamicina incluye los fármacos "clásicos" de rifamicina, así como los derivados de la rifamicina, rifampicina (rifampicina, N.º de Reg. CA 13292-46-1), rifabutina (N.º de Reg. CA 72559-06-9; documento US 2011/0178001), rifapentina y rifalazil (N.º de Reg. CA 129791-92-0, Rothstein et al (2003) Expert Opin. Investig. Drugs 12(2):255-271; Fujii et al (1994) Antimicrob. Agents Chemother. 38:1118-1122. Muchos antibióticos de tipo rifamicina comparten la propiedad perjudicial del desarrollo de resistencia (Wichelhaus et al (2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153-156). Las rifamicinas se aislaron por primera vez en 1957 de un cultivo de fermentación de *Streptomyces mediterranei*. Se descubrieron alrededor de siete rifamicinas, denominadas Rifamicina A, B, C, D, E, S y SV (documento US 3150046). La rifamicina B fue la primera introducida comercialmente y fue útil en el tratamiento de la tuberculosis resistente a fármacos en la década de 1960. Las rifamicinas se han utilizado para el tratamiento de muchas enfermedades, siendo la más importante la tuberculosis relacionada con el VIH. Debido a la gran cantidad de análogos y derivados disponibles, las rifamicinas se han

utilizado ampliamente en la eliminación de bacterias patógenas que se han vuelto resistentes a los antibióticos utilizados habitualmente. Por ejemplo, la rifampicina es conocida por su potente efecto y su capacidad para prevenir la resistencia a fármacos. Destruye rápidamente cepas de bacilos de división rápida, así como células "persistentes", que permanecen biológicamente inactivos durante largos períodos de tiempo que les permiten evadir la actividad antibiótica. Además, la rifabutina y la rifapentina se han utilizado contra la tuberculosis adquirida en pacientes con VIH.

Los restos antibióticos (abx) de los conjugados anticuerpo-antibiótico de Fórmula I son restos de tipo rifamicina que tienen la estructura:



en donde:

las líneas discontinuas indican un enlace opcional;

R es H, alquilo C₁-C₁₂ o C(O)CH₃;

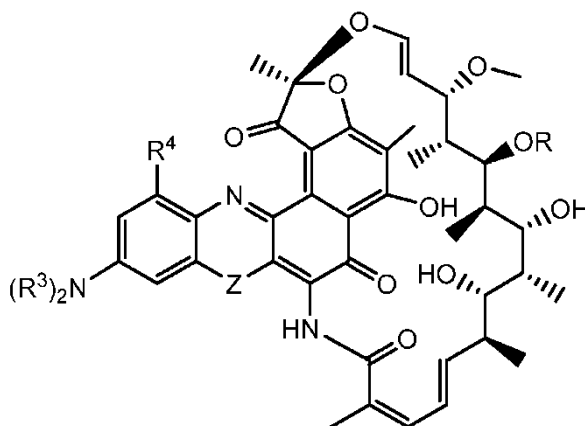
R¹ es OH;

R² es CH=N-(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de C(O)CH₃, alquilo C₁-C₁₂, heteroarilo C₁-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀ y carbociclilo C₃-C₁₂;

o R¹ y R² forman un heteroarilo o heterociclilo de cinco o seis miembros fusionado y formando, opcionalmente, un anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente por H, F, Cl, Br, I, alquilo C₁-C₁₂ u OH; y

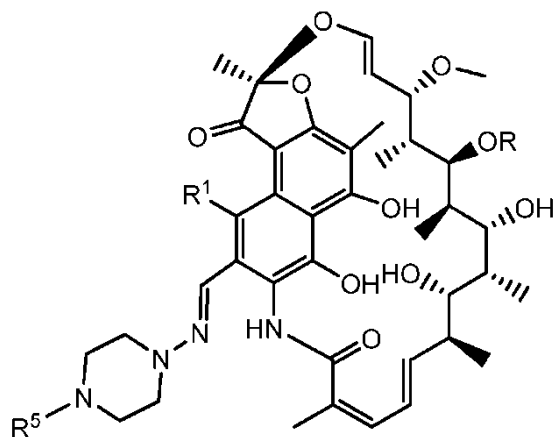
donde el enlazador peptídico L está fijado covalentemente a R².

Un ejemplo de un resto de tipo rifamicina es:



en donde R³ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₁₂; R⁴ se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C₁-C₁₂ y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquilo C₁-C₁₂), O y S; y donde el enlazador peptídico L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de N (R³)₂.

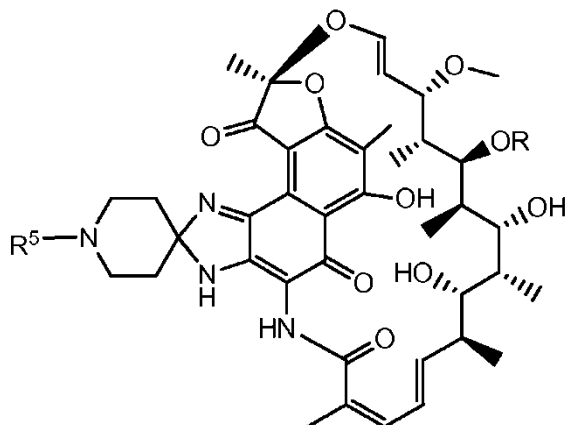
Un ejemplo de un resto de tipo rifampicina es:



en donde

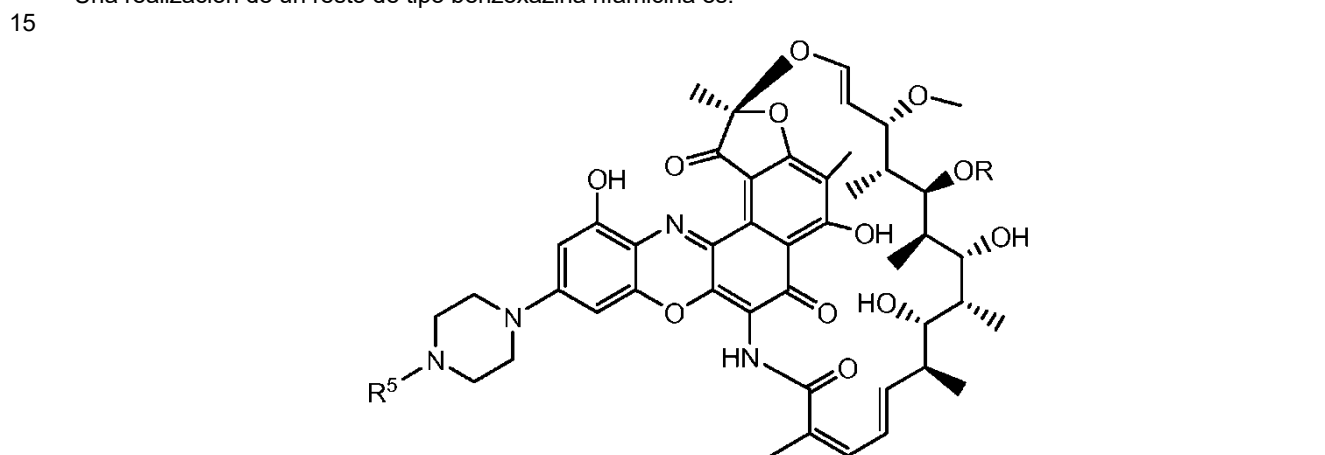
5 R^5 se selecciona de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y donde el péptido enlazador L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de NR^5 .

Un ejemplo de un resto de tipo rifabutina es:



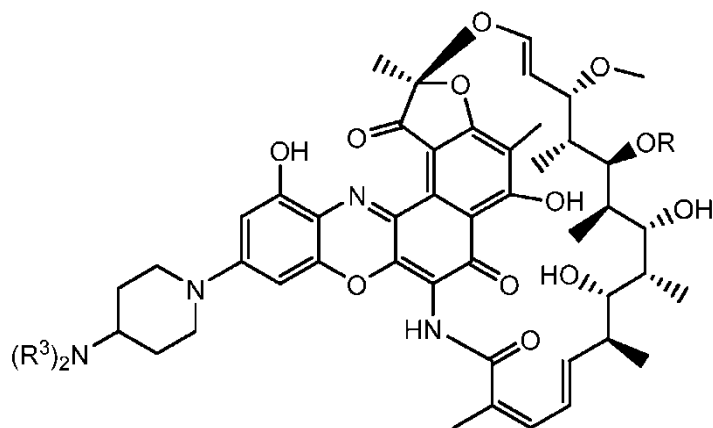
10 en donde R^5 se selecciona de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y donde el péptido enlazador L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de NR^5 .

Una realización de un resto de tipo benzoxazina rifamicina es:



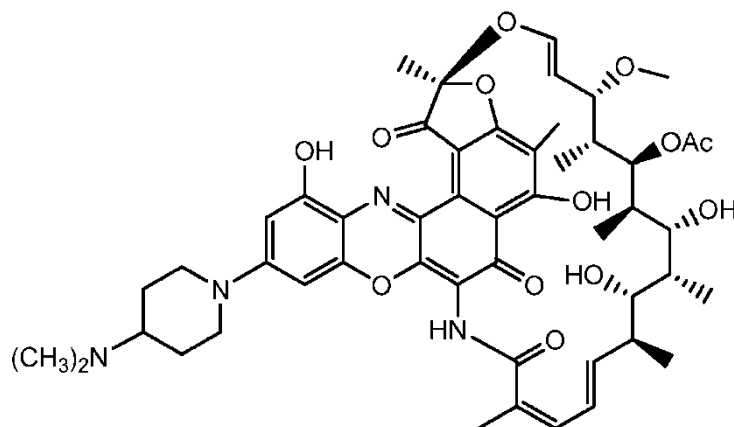
20 en donde R^5 se selecciona de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y donde el péptido enlazador L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de NR^5 .

Una realización de un resto de tipo benzoxazina rifamicina, denominado en el presente documento pipBOR, es:



en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_{12} ; y donde el enlazador peptídico L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de N (R^3)₂.

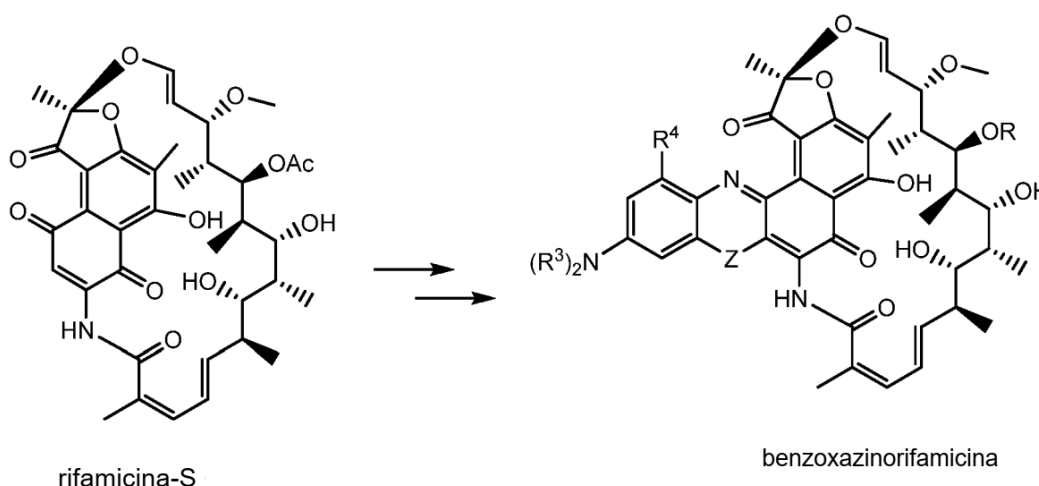
5 Una realización de un resto de tipo benzoxazina rifamicina, denominado en el presente documento dimetil pipBOR, es:



10 donde el péptido enlazador L está fijado covalentemente al átomo de nitrógeno de N (CH_3)₂.

El derivado semisintético rifamicina S, o la forma reducida de sal de sodio rifamicina SV, se puede convertir a antibióticos de tipo Rifalazil en varias etapas, donde R es H o Ac, R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_{12} ; R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12} y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquilo C_1-C_{12}), O y S, como se ejemplifica en las Figuras 9-11. Se pueden preparar benzoxazina (Z = O), benzotiazina (Z = S), benzdiazina (Z = NH, N(alquilo C_1-C_{12})) rifamicinas (documento US 7271165). Los análogos de benzoxazina rifamicina (BOR), benzotiazinarifamicina (BTR) y benzdiazinarifamicina (BDR) que contienen sustituyentes se numeran de acuerdo con el esquema de numeración proporcionado en la fórmula A en la columna 28 en el documento US 7271165. Por "25-O-desacetil" rifamicina se entiende un análogo de rifamicina en el que se ha eliminado el grupo acetilo en la posición 25. Los análogos en los que esta posición se derivatiza adicionalmente se denominan "25-O-desacetil-25-(sustituyente)rifamicina", en el que la nomenclatura para el grupo derivatizador reemplaza "sustituyente" en el nombre completo del compuesto.

25 Los restos antibióticos de tipo rifamicina se pueden sintetizar por métodos análogos a los descritos en el documento US 4610919; documento US 4983602; documento US 5786349; documento US 5981522; documento US 4859661; documento US 7271165; el documento US 2011/0178001; Seligson, et al., (2001) AntiCancer Drugs 12:305-13; Chem. Pharm. Bull., (1993) 41:148). Los restos antibióticos de tipo rifamicina pueden explorarse para detectar actividad antimicrobiana midiendo su concentración inhibidora mínima (MIC), utilizando ensayos *in vitro* con MIC patrón (Tomioka et al., (1993) Antimicrob. Agents Chemother. 37:67).



ENLAZADORES PEPTÍDICOS

5 Un "enlazador peptídico" (L) es un resto bifuncional o multifuncional que se fija covalentemente a uno o más restos antibióticos (abx) y a una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) de Fórmula I. Los enlazadores peptídicos en los AAC son sustratos para la escisión por proteasas intracelulares, incluyendo condiciones lisosómicas. Las proteasas incluyen diferentes catepsinas y caspasas. La escisión del enlazador peptídico de un AAC dentro de una célula puede liberar el antibiótico de tipo rifamicina con efectos antibacterianos.

10 La cantidad de antibiótico activo liberado de la escisión de AAC se puede medir mediante el ensayo de liberación de Caspasa del Ejemplo 20.

15 Los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) pueden prepararse convenientemente usando un reactivo enlazador o producto intermedio enlazador-antibiótico que tiene una funcionalidad reactiva para unirse al antibiótico (abx) y al anticuerpo (Ab). En una realización a modo de ejemplo, un tiol de la cisteína de un anticuerpo (Ac) modificado por ingeniería con cisteína puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo enlazador, con un resto antibiótico o con un producto intermedio antibiótico-enlazador.

20 El resto enlazador peptídico de un AAC, en un aspecto, un reactivo enlazador o un producto intermedio enlazador-antibiótico tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a una cisteína nucleófila presente en un anticuerpo. El tiol de la cisteína del anticuerpo es reactivo con un grupo electrófilo en un reactivo enlazador o enlazador-antibiótico, formando un enlace covalente. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

25 Los anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína reaccionan con reactivos enlazadores o productos intermedios enlazador-antibiótico, con los grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α -halocarbonilo, de acuerdo con el procedimiento de conjugación de la página 766 de Klussman et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773 y de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 19.

30 En otra realización, el grupo reactivo de un reactivo enlazador o producto intermedio enlazador-antibiótico contiene un grupo funcional tiol reactivo que puede formar un enlace con un tiol de la cisteína libre de un anticuerpo. Ejemplos de grupos funcionales de reacción con tiol incluyen, pero sin limitación, maleimida, α -haloacetilo, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

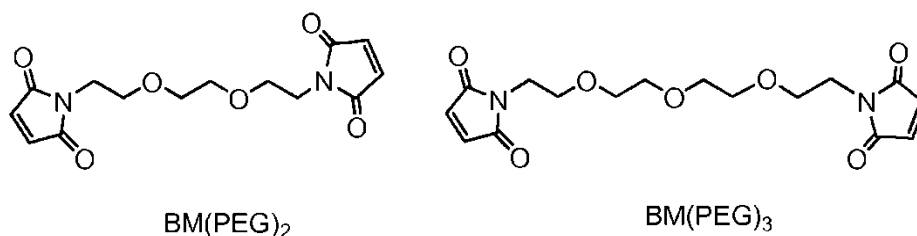
35 En otra realización, un reactivo enlazador o producto intermedio antibiótico-enlazador tiene un grupo funcional reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos de un anticuerpo útiles incluyen, pero sin limitación, disulfuro de piridilo, grupos carbonilo de aldehídos y cetonas. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un reactivo enlazador o producto intermedio antibiótico-enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente a una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un reactivo enlazador o intermedio antibiótico-enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, tiol, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la fijación a un reactivo enlazador o producto intermedio antibiótico-enlazador.

45 Un enlazador peptídico puede comprender uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores a modo de ejemplo incluyen una unidad peptídica, 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe") y p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), N-succinimidil 4-(2-

piridiltio)pentanoato ("SPP") y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("MCC"). Se conocen diferentes componentes enlazadores en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

En otra realización, el enlazador puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o la reactividad. Por ejemplo, un sustituyente cargado tal como sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) o amonio, puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo enlazador con el resto anticuerpo o antibiótico, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ac-L (producto intermedio anticuerpo-enlazador) con abx, o abx-L (producto intermedio antibiótico-enlazador) con Ac, dependiendo de la vía de síntesis empleada para preparar los AAC.

Los AAC de la invención contemplan expresamente, pero sin limitación, aquellos preparados con reactivos enlazadores: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB, SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) y reactivos de bismaleimida tales como DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, BM(PEG)₂ y BM(PEG)₃. Los reactivos de bismaleimida permiten la fijación del grupo tiol de un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína a un resto antibiótico, marcador o producto intermedio enlazador que contiene tiol, de forma secuencial o convergente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína, con un resto antibiótico o con un producto intermedio enlazador-antibiótico incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato e isotiocianato.



También se pueden obtener reactivos enlazadores útiles a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; documentos US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

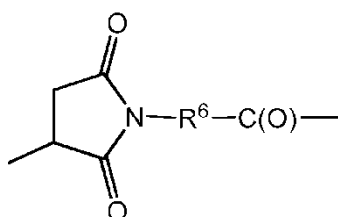
En otra realización, el resto enlazador peptídico de un AAC comprende un enlazador de tipo dendrítico para la fijación covalente de más de un resto antibiótico a través de un resto enlazador multifuncional ramificado a un anticuerpo (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de antibiótico a anticuerpo, es decir la carga, que está relacionada con la potencia de los AAC. Por lo tanto, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína lleva únicamente un grupo tiol de la cisteína reactivo, se pueden fijar gran cantidad de restos antibióticos mediante un enlazador dendrítico.

En determinadas realizaciones de AAC de Fórmula I, el péptido enlazador tiene la fórmula:



donde Str es una unidad extensora unida covalentemente al anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA); Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora fijada covalentemente al antibiótico de tipo rifamicina. Realizaciones a modo de ejemplo de tales enlazadores se describen en el documento US 7498298.

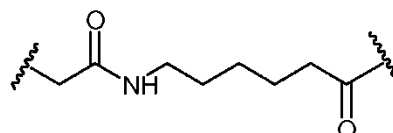
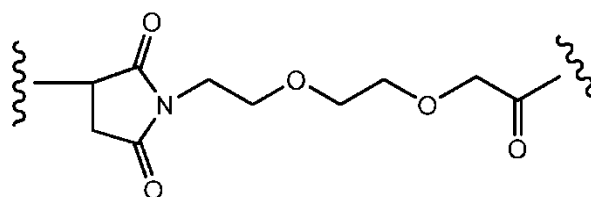
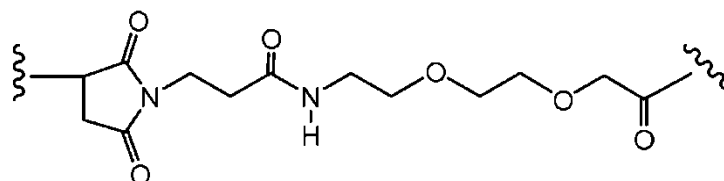
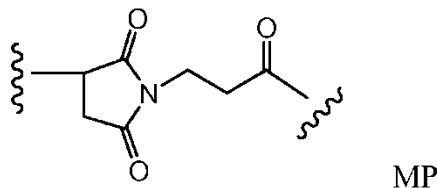
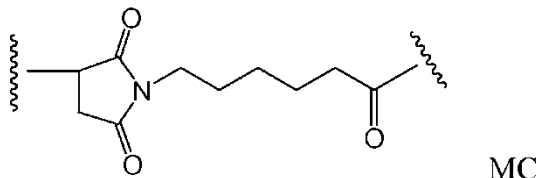
En una realización, una unidad extensora "Str" tiene la fórmula:



en donde R⁶ se selecciona del grupo que consiste en -alquileo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arileno-, -alquileo-arileno C₁-C₁₀, -arileno-alquileo C₁-C₁₀, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-

, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ y $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{-CH}_2$; y r es un número entero que varía de 1 a 10.

Las unidades extensoras a modo de ejemplo se muestran a continuación (en donde la línea ondulada indica sitios de fijación covalente a un anticuerpo):



Una unidad peptídica "Pep" comprende dos o más restos de aminoácidos que se producen de forma natural, incluidos los veinte aminoácidos principales, así como los aminoácidos minoritarios tales como citrulina, que son bien conocidos en el campo de la bioquímica. Los aminoácidos se distinguen por su cadena lateral. La unidad peptídica comprende así dos o más cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo, pero sin limitación, $-\text{CH}_3$ (alanina), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ (arginina), $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (asparagina), $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (ácido aspártico), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$ (citrulina), $-\text{CH}_2\text{SH}$ (cisteína), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ (ácido glutámico), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ (glutamina), $-\text{H}$ (glicina), $-\text{CH}_2(\text{imidazolil})$ (histidina), $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (isoleucina), $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ (leucina), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (lisina), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ (metionina), $-\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$ (fenilalanina), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ (prolina), $-\text{CH}_2\text{OH}$ (serina), $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (treonina), $-\text{CH}_2(\text{indol})$ (triptófano), $-\text{CH}_2(\text{p-C}_6\text{H}_4\text{OH})$ (tirosina), $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ (valina). Véanse las páginas 1076-1077, "Organic Chemistry" 5ª Ed. John McMurry, Brooks/Cole pub. (2000). Los restos de aminoácidos de la unidad peptídica incluyen todos los estereoisómeros y pueden estar en las configuraciones D o L.

En una realización, Pep comprende de dos a doce restos de aminoácidos seleccionados independientemente de glicina, alanina, fenilalanina, lisina, arginina, valina y citrulina. En una de dichas realizaciones, la unidad de aminoácidos permite la escisión del enlazador por una proteasa, facilitando así la liberación del antibiótico del AAC tras la exposición a proteasas intracelulares, tales como enzimas lisosómicas (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Las unidades de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, un pentapéptido y un hexapéptido. Los dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe); fenilalanina-lisina (fk o fen-lis); o N-metil-valina-citrulina (Me-val-cit). Los tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (glic-val-cit), valina-citrulina-fenilalanina (val-cit-phe) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los enlazadores peptídicos adicionales incluyen GGAFFAGG (SEQ ID NO: 126); tpm-cit; GPIMeLFF (SEQ ID NO: 129); y LAFG (SEQ ID NO: 128). Los enlazadores peptídicos se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (E.

Schröder y K. Lubke (1965) "The Peptides", volumen 1, páginas 76-136, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Las unidades de aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas concretas, por ejemplo, una proteasa asociada a tumores, catepsina B, C y D, o una proteasa plasmína.

En una realización, la unidad espaciadora Y comprende paraaminobencilo o paraaminobenciloxicarbonilo. Una unidad espaciadora "no autoinmolativa" es aquella en donde parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al resto antibiótico tras la escisión enzimática (por ejemplo, proteolítica) del AAC. Ejemplos de unidades espaciadoras no autoinmolativas incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de glicina y una unidad espaciadora de glicina-glicina. También se contemplan otras combinaciones de espaciadores peptídicos susceptibles de escisión enzimática específica de secuencia. Por ejemplo, la escisión enzimática de un AAC que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina por una proteasa asociada a células tumorales daría como resultado la liberación de un resto glicina-glicina-antibiótico del resto del AAC. En una de dichas realizaciones, el resto glicina-glicina-antibiótico se somete después a una etapa de hidrólisis separada en la célula tumoral, escindiendo así la unidad espaciadora de glicina-glicina del resto antibiótico.

Una unidad espaciadora permite la liberación del resto antibiótico sin una etapa de hidrólisis separada. Una unidad espaciadora puede ser "autoinmolativa" o "no autoinmolativa". En determinadas realizaciones, una unidad espaciadora de un enlazador comprende una unidad p-aminobencilo (PAB). En una de dichas realizaciones, se fija un alcohol p-aminobencílico a una unidad de aminoácidos a través de un enlace amida, un carbamato, metilcarbamato o carbonato entre el grupo p-aminobencilo y el resto antibiótico (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103). En una realización, la unidad espaciadora es p-aminobenciloxicarbonilo (PAB).

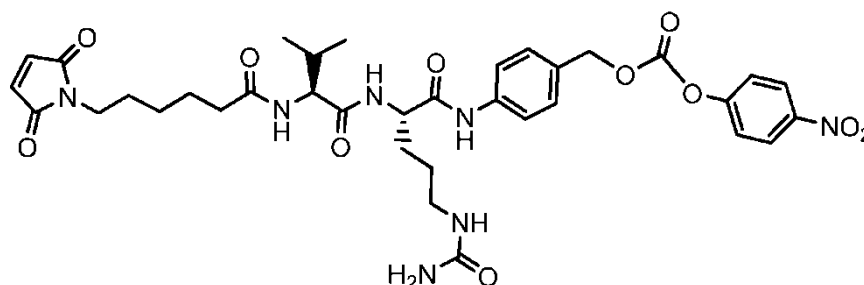
En una realización, el antibiótico forma una amina cuaternaria, tal como el grupo dimetilaminopiperidilo, cuando se fija a la unidad espaciadora PAB del enlazador peptídico. Ejemplos de tales aminas cuaternarias son los productos intermedios enlazador-antibiótico (LA) 54, 61, 66, 67, 73, 74, 76, 78, 79, 83, 84 de la Tabla 2. El grupo amina cuaternaria puede modular la escisión del resto antibiótico para optimizar los efectos antibacterianos del AAC. En otra realización, el antibiótico está enlazado a la unidad espaciadora PABC del enlazador peptídico, formando un grupo funcional carbamato en el AAC. Tal grupo funcional carbamato también puede optimizar los efectos antibacterianos del AAC. Ejemplos de productos intermedios enlazador-antibiótico (LA) con PABC carbamato son 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 62, 63, 64, 65, 72, 75, 80, 81, 87 de la Tabla 2. Otros productos intermedios enlazador-antibiótico (LA) emplean grupos amida (59, 69, 70, 71, 77, 82, 85) o fenólicos (60, 68, 86).

Otros ejemplos de espaciadores autoinmolativos incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (documento US 7375078; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto- o paraaminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituido y no sustituido (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidas por glicina (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27:1447) también es un ejemplo de espaciadores autoinmolativos útiles en AAC.

PRODUCTOS INTERMEDIOS ENLAZADOR-ANTIBIÓTICO ÚTILES PARA AAC

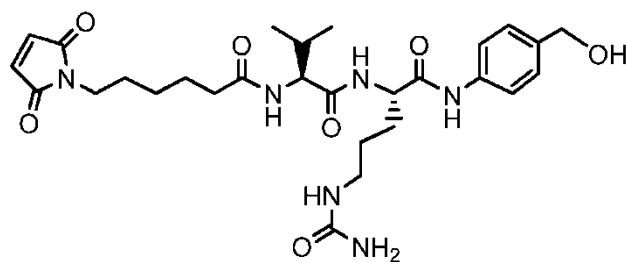
Los productos intermedios enlazador-antibiótico (LA) de Fórmula II y la Tabla 2 se prepararon acoplando un resto antibiótico de tipo rifamicina con un reactivo enlazador peptídico, tal como se ejemplifica en las Figuras 23-25 y en los Ejemplos 1-17. Los reactivos enlazadores se prepararon por los métodos descritos en los documentos WO 2012/113847; US 7659241; US 7498298; US 20090111756; Estados Unidos 2009/0018086; US 6214345; Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855-869, incluyendo:

4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato 6



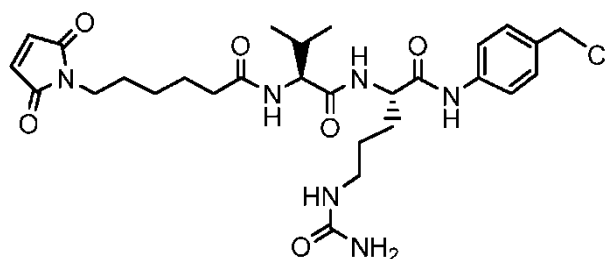
6

6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida **8**

**8**

5

N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9**

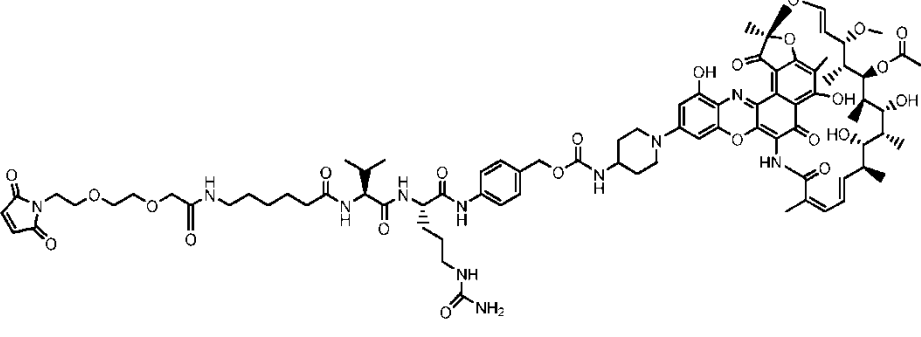
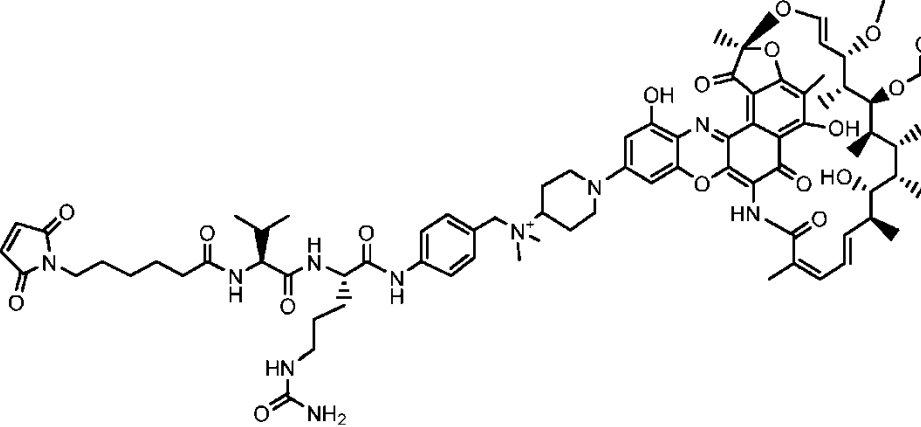
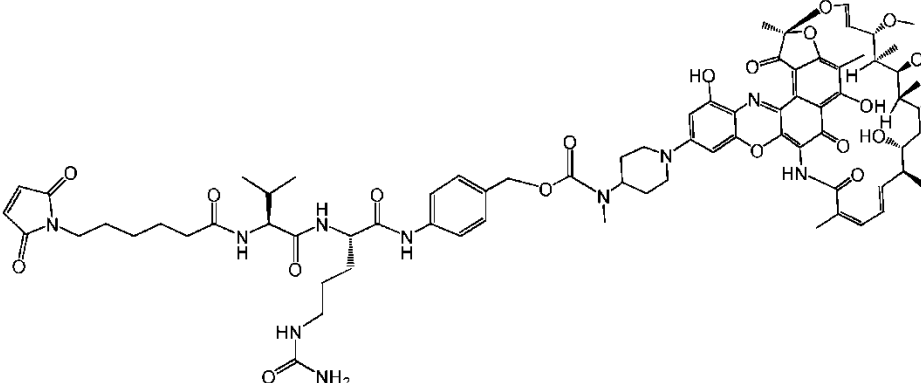
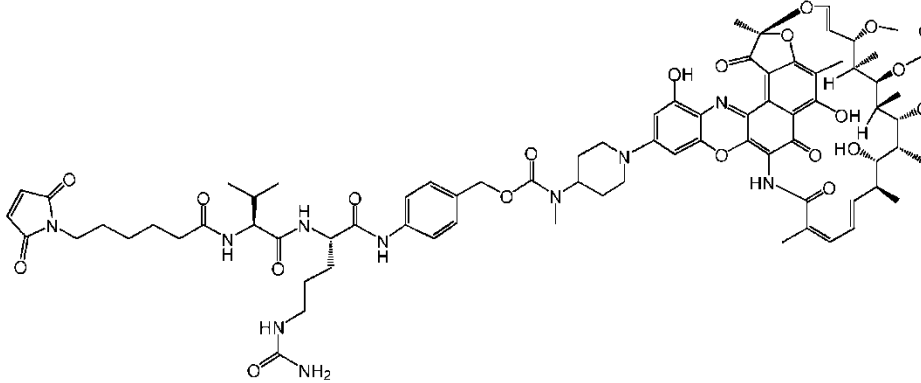
**9**

10

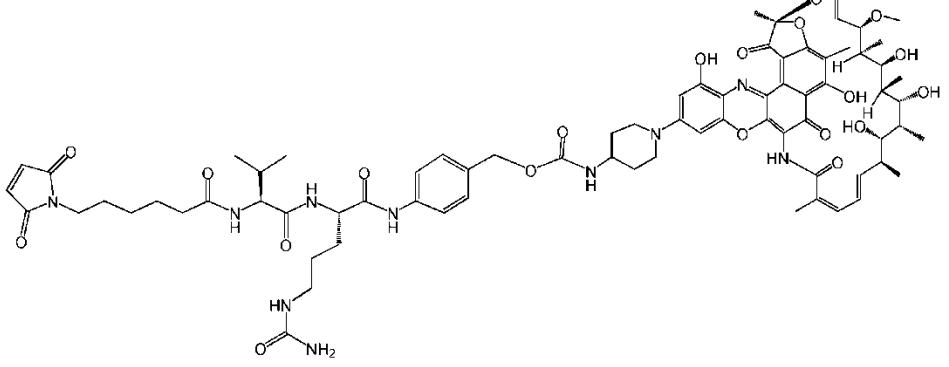
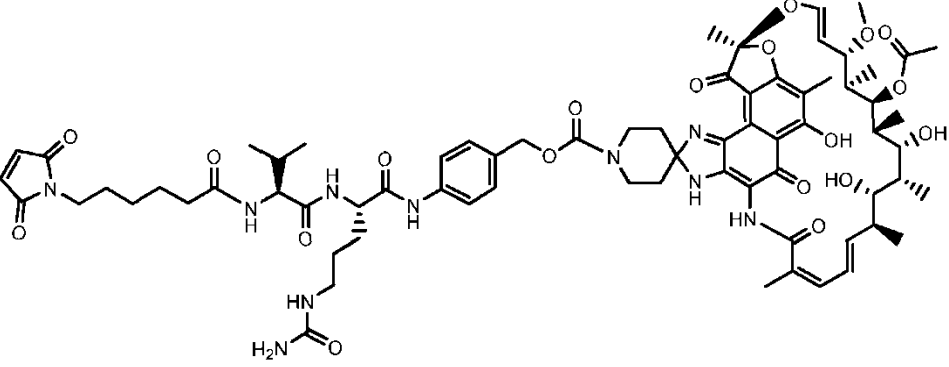
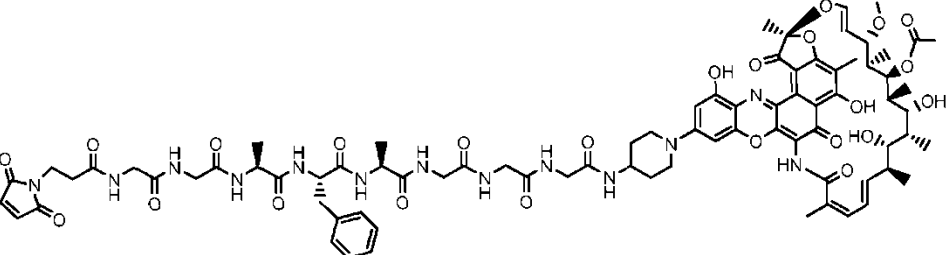
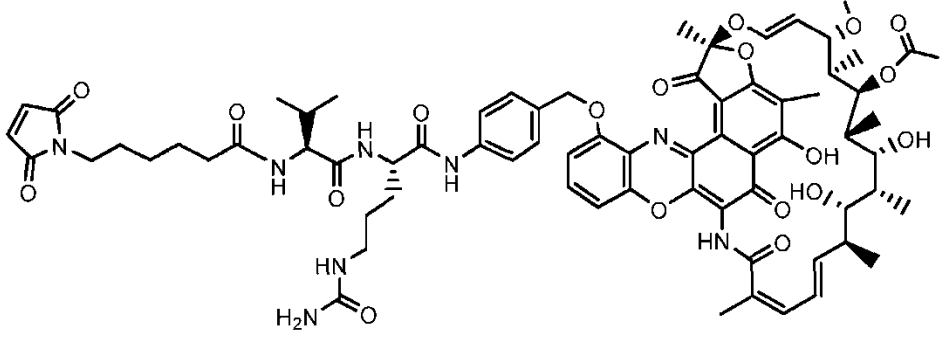
Tabla 2 Productos intermedios enlazador-antibiótico (LA)

N.º de LA	Estructura
LA-51	
LA-52	

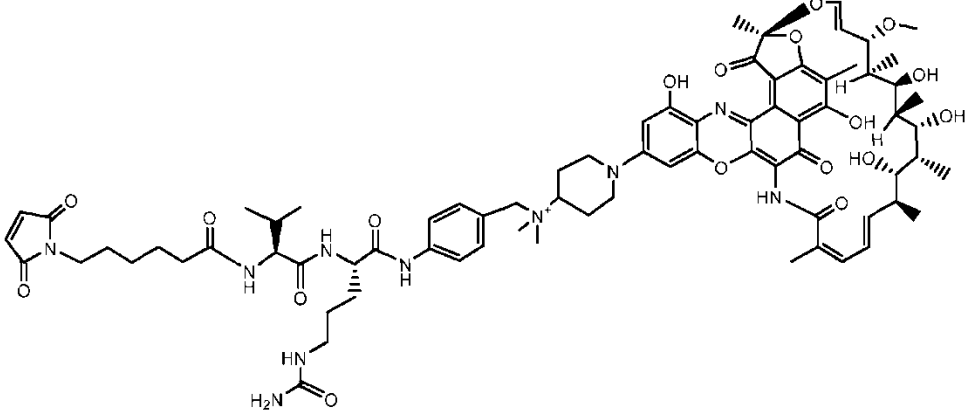
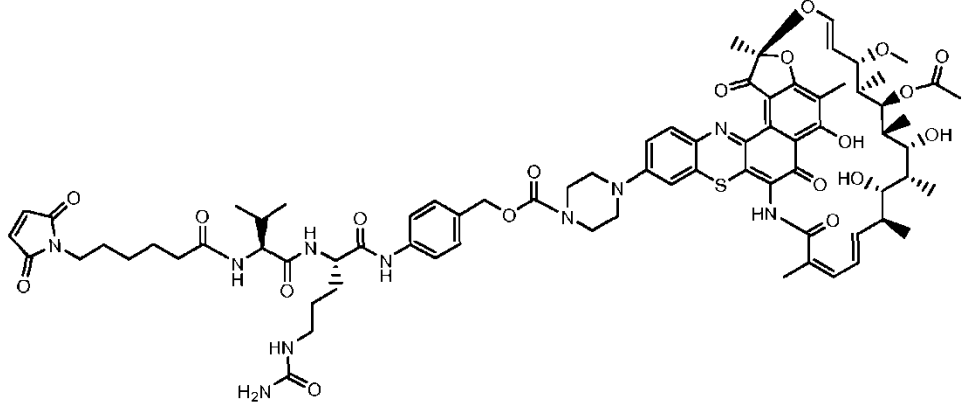
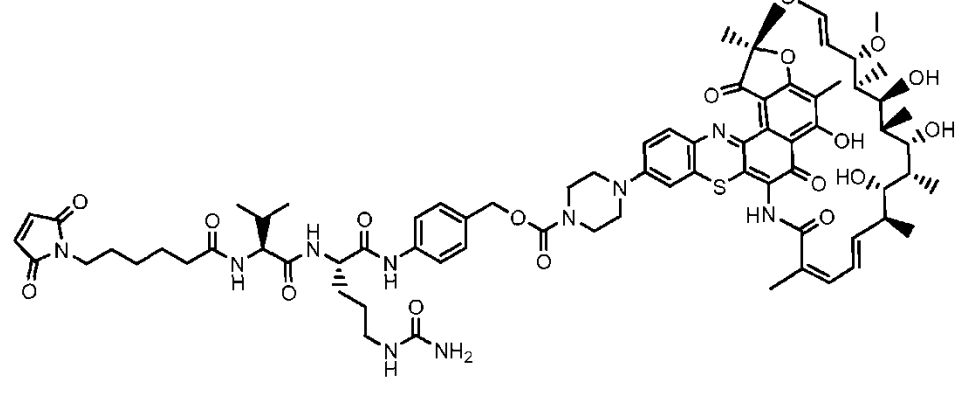
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-53	
LA-54	
LA-55	
LA-56	

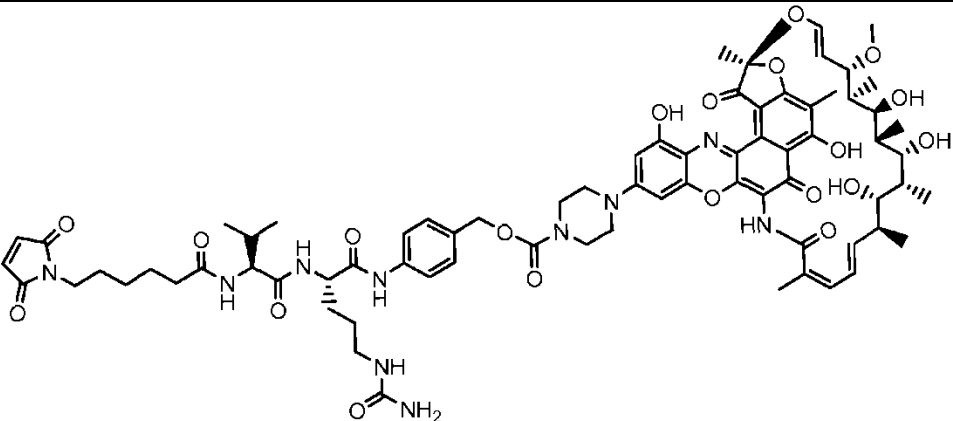
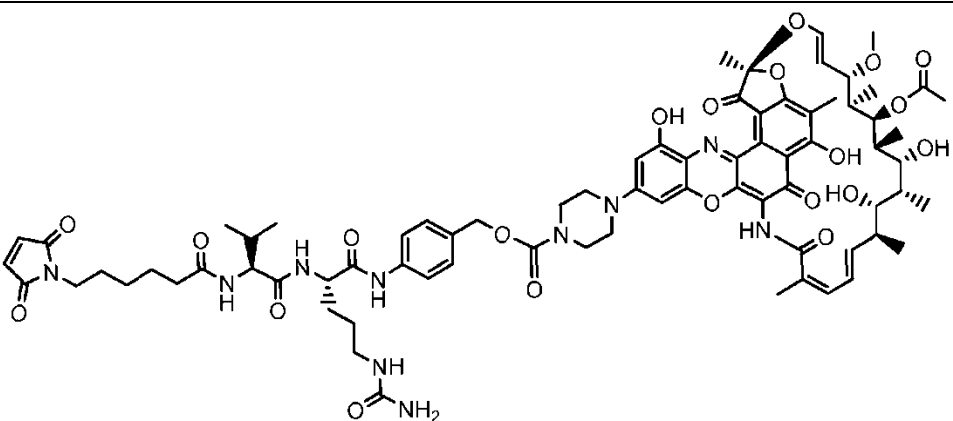
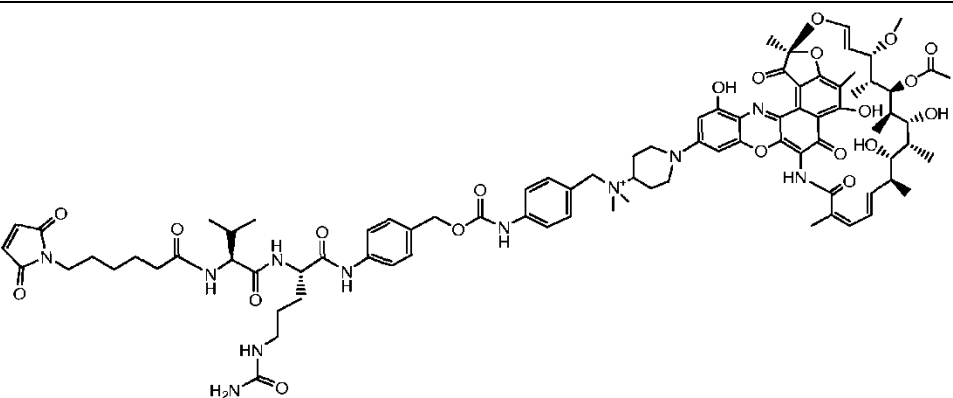
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-57	
LA-58	
LA-59	
LA-60	

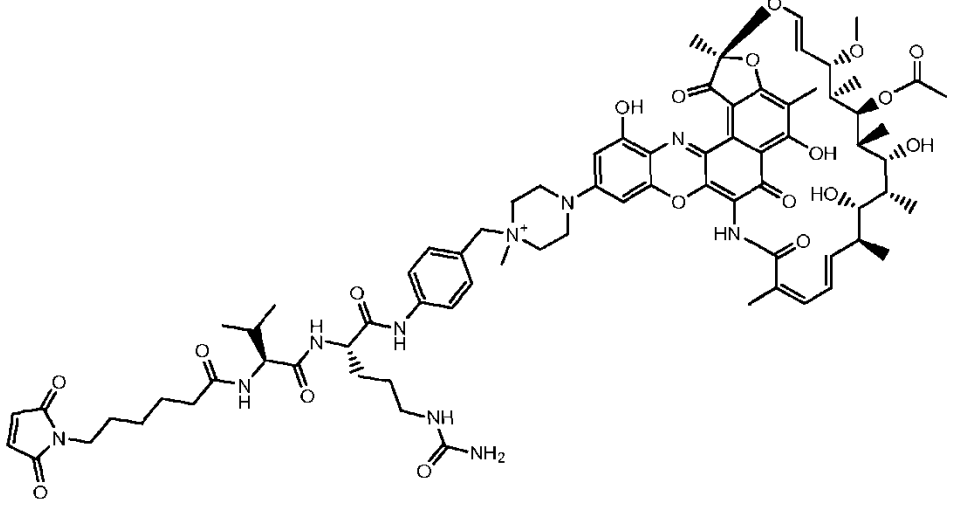
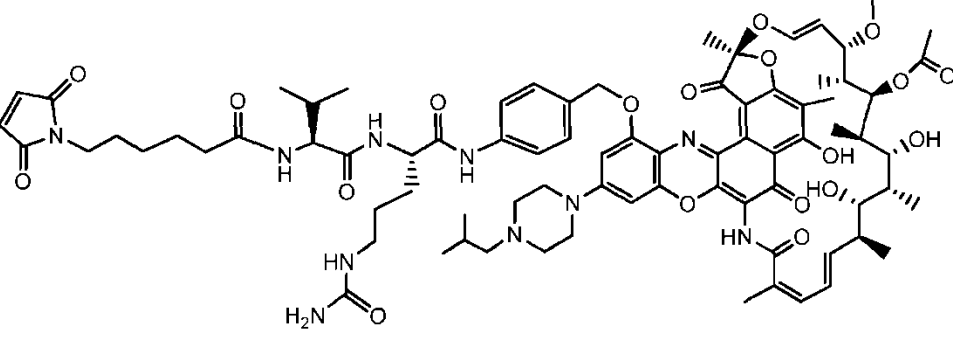
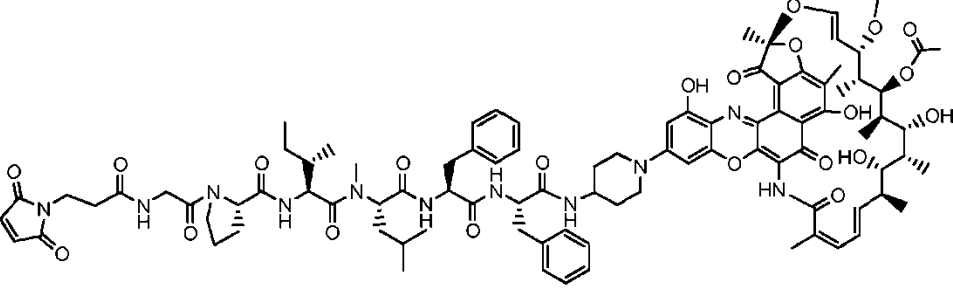
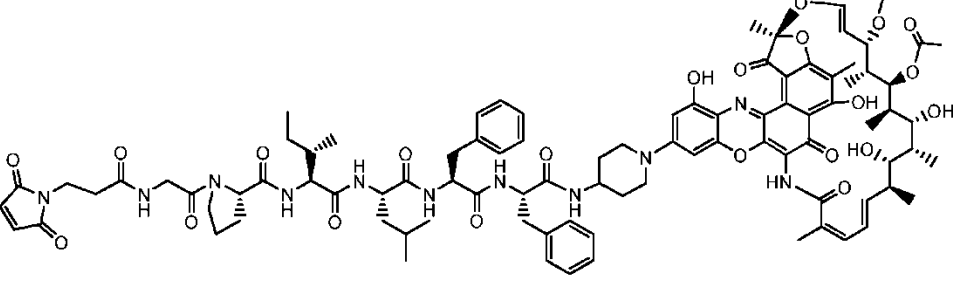
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-61	
LA-62	
LA-63	

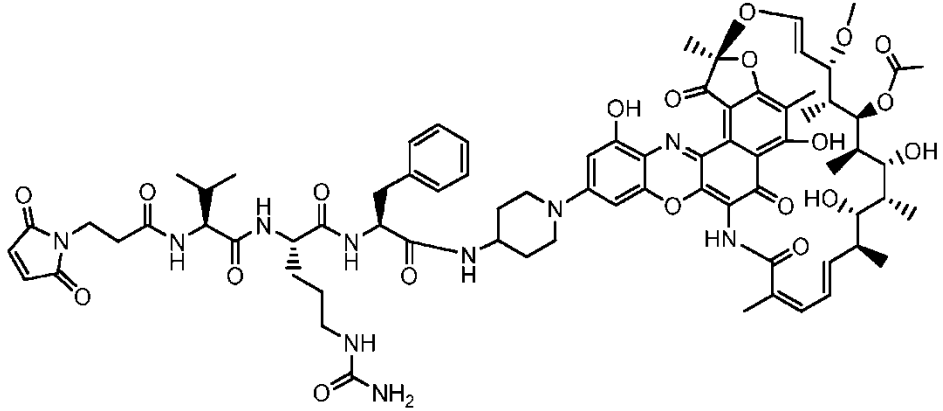
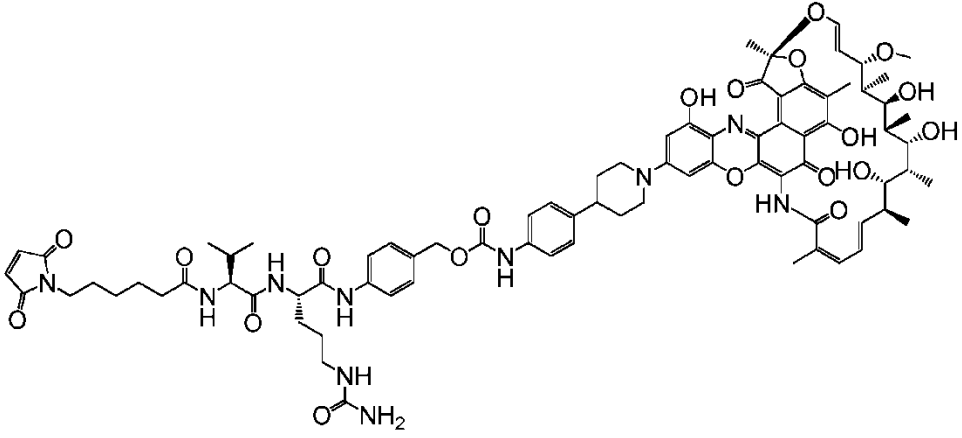
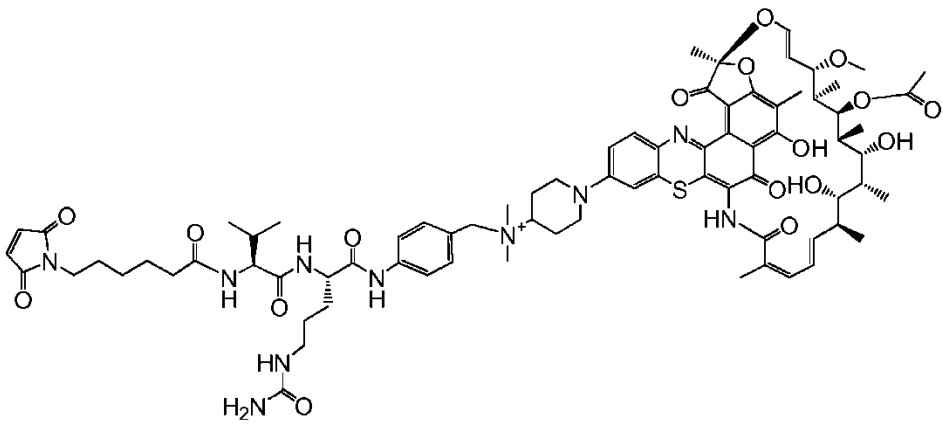
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-64	
LA-65	
LA-66	

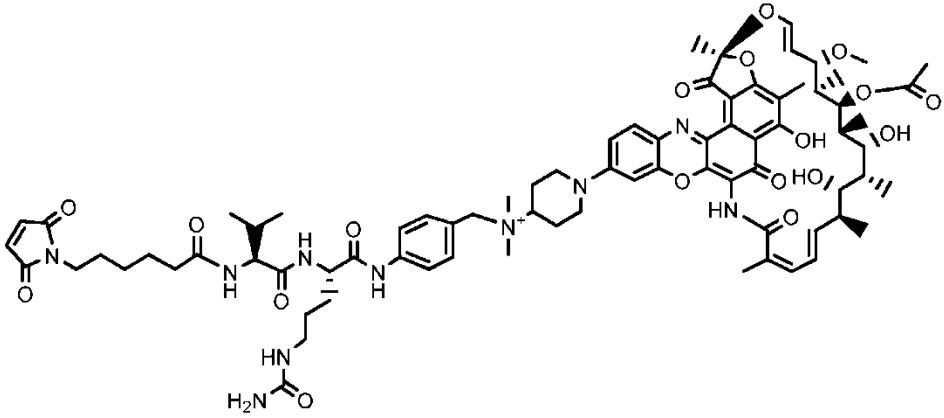
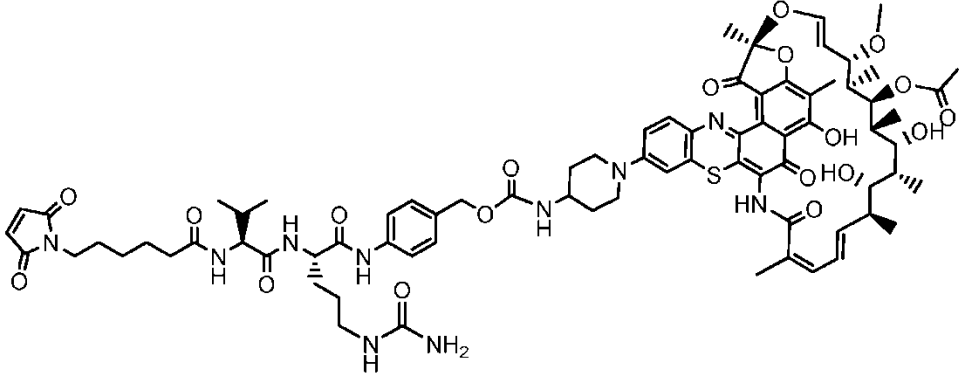
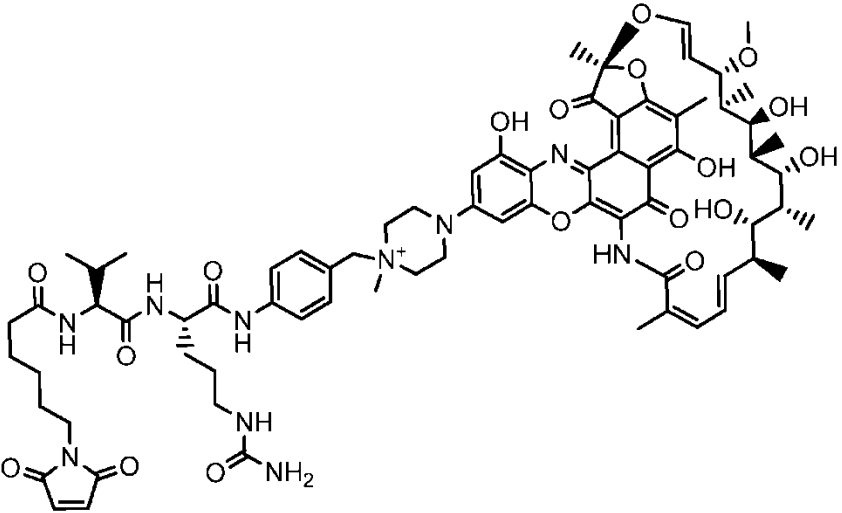
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-67	
LA-68	
LA-69	
LA-70	

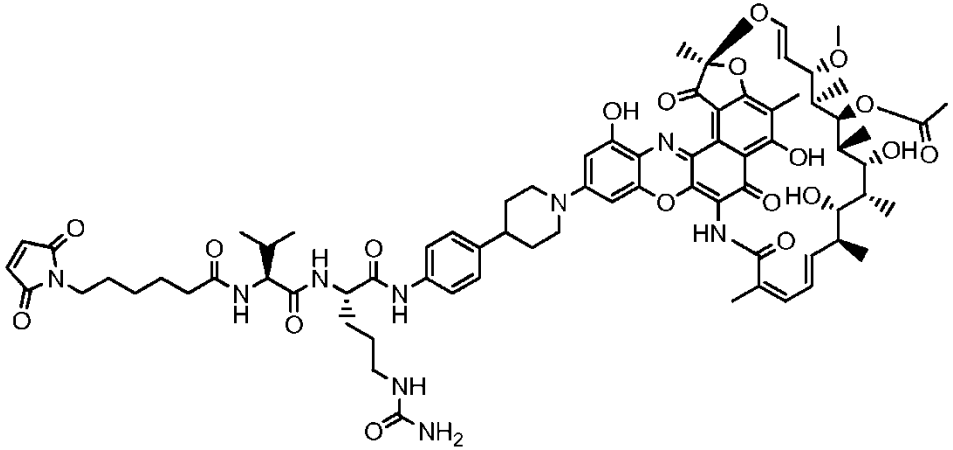
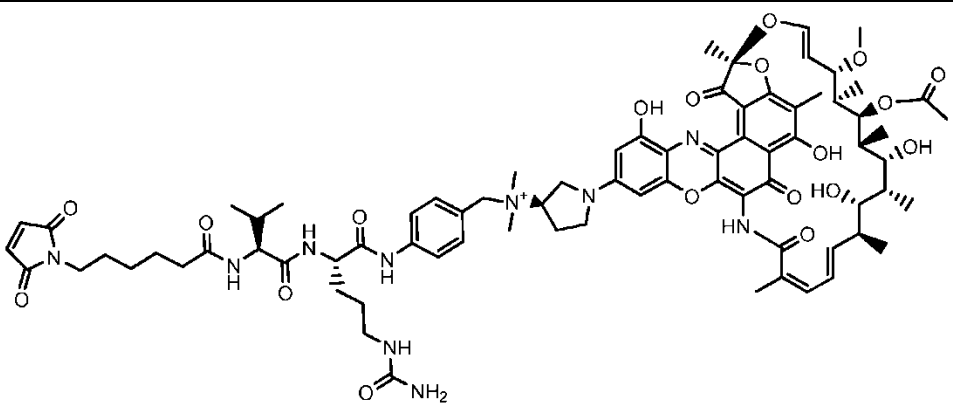
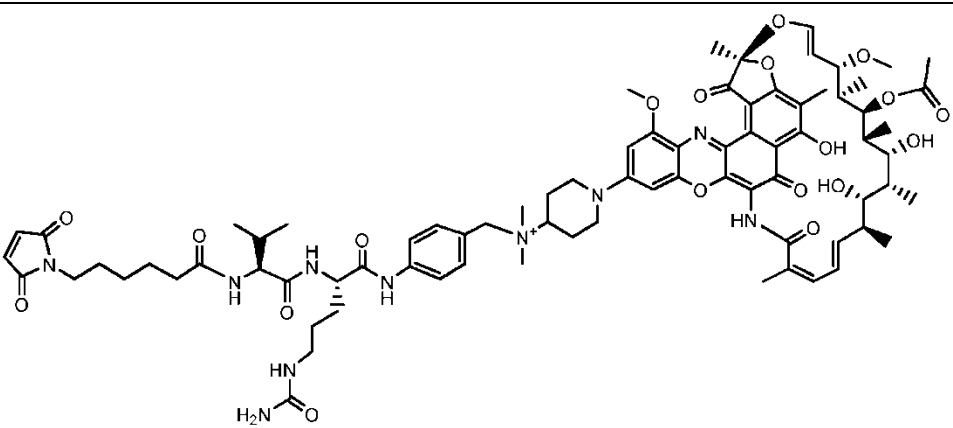
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-71	
LA-72	
LA-73	

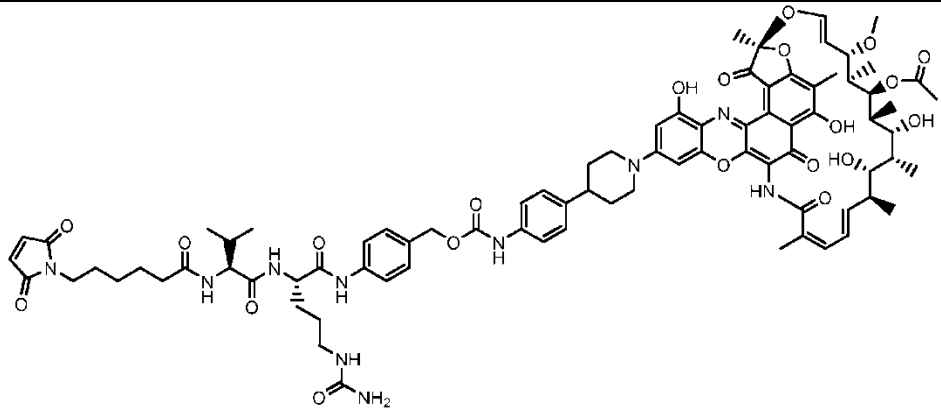
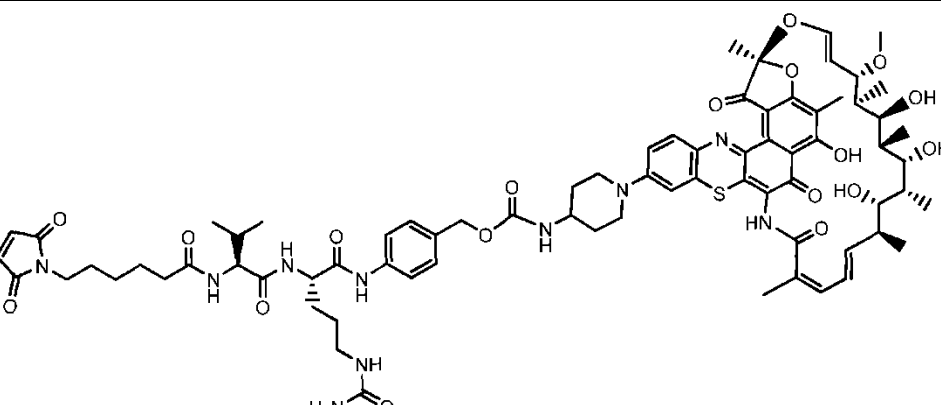
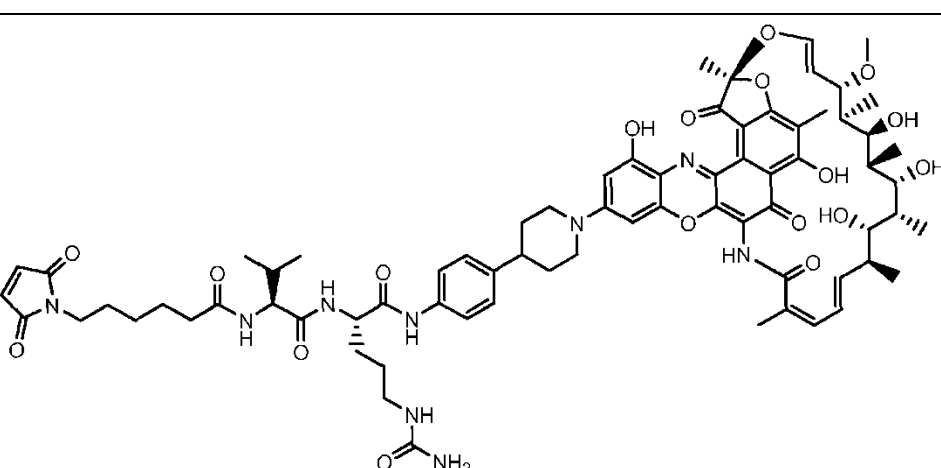
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-74	
LA-75	
LA-76	

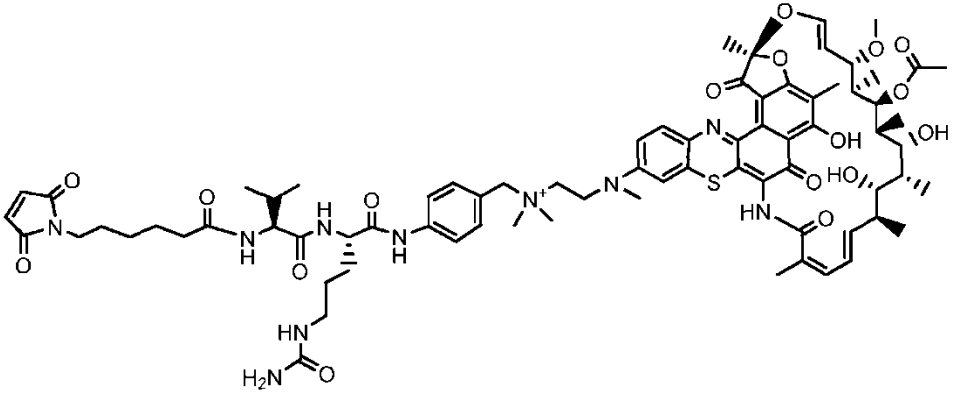
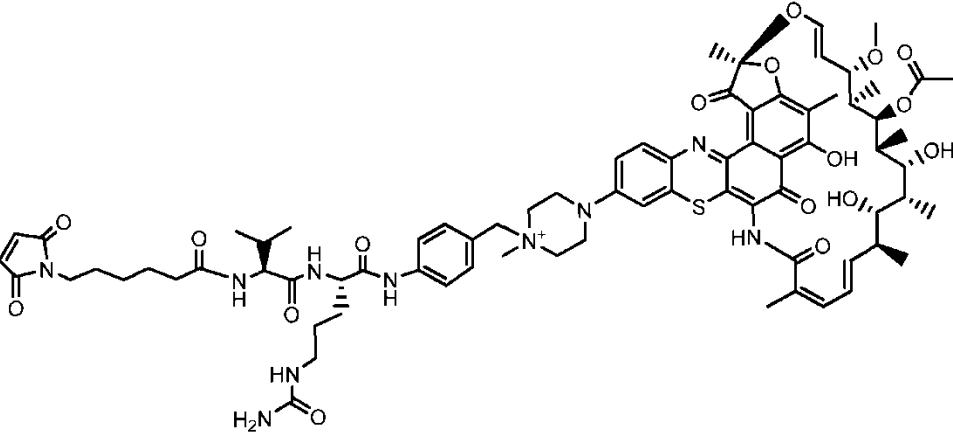
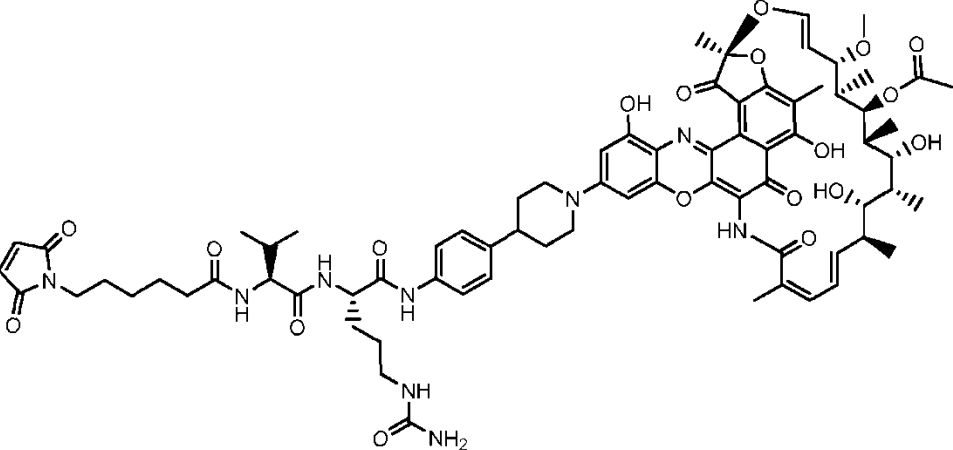
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-77	
LA-78	
LA-79	

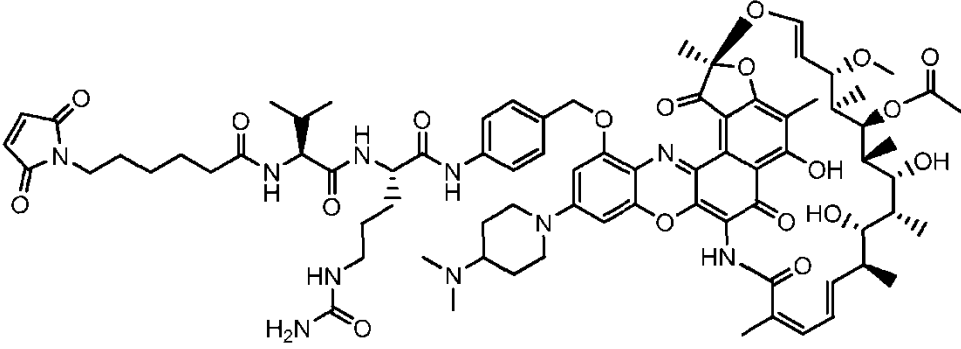
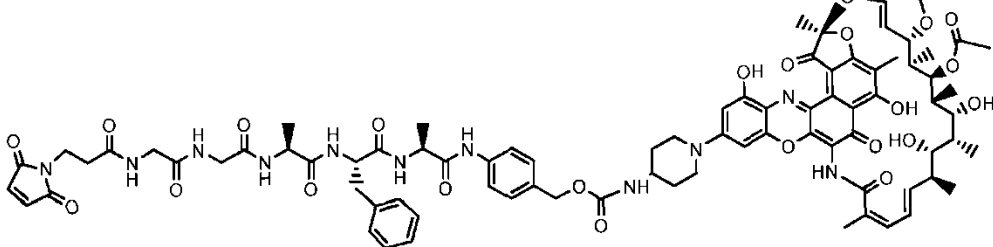
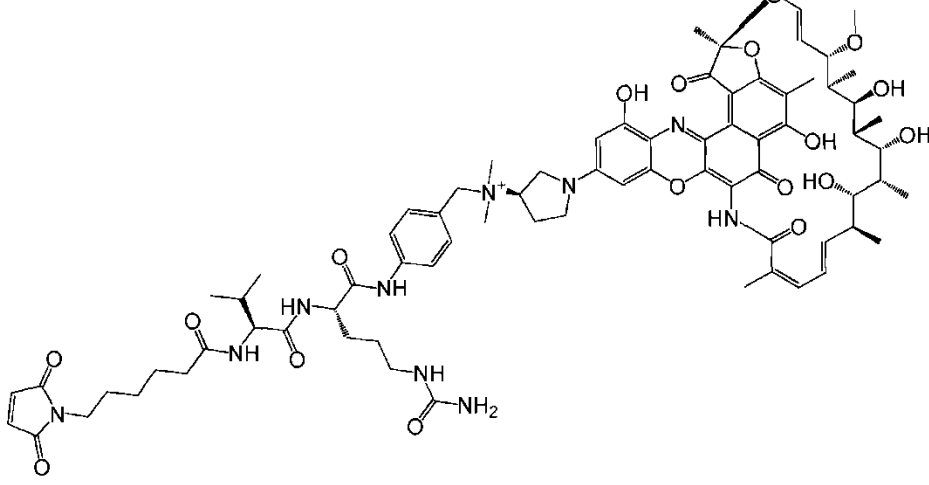
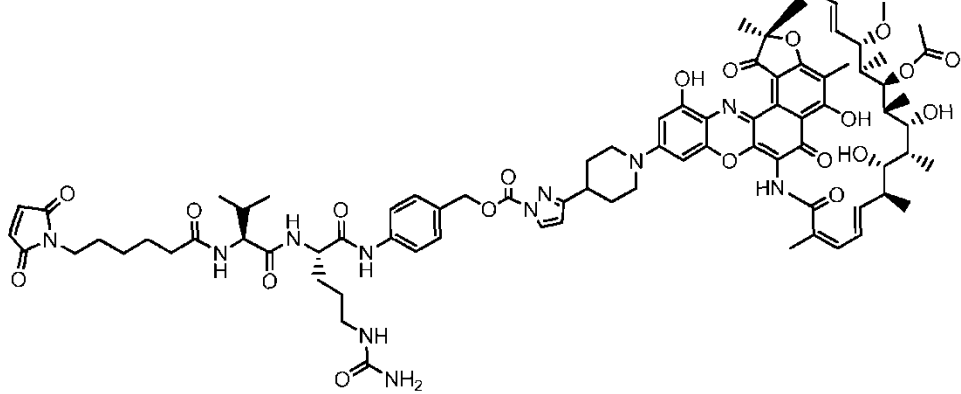
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-80	 Chemical structure of LA-80, a complex molecule featuring a large polycyclic aromatic system (likely a xanthone derivative) with multiple hydroxyl groups and a piperidine ring. This system is linked via an amide bond to a benzyl group, which is further connected to a piperidine ring. The piperidine ring is linked to a chiral center (marked with a wedge bond) that is part of a chain containing a succinimide ring, a hexamethylene chain, and a terminal amide group (NH₂).
LA-81	 Chemical structure of LA-81, similar to LA-80, but with a different substitution pattern on the polycyclic aromatic system, including a sulfur atom in the ring system. The linker and terminal groups are identical to those in LA-80.
LA-82	 Chemical structure of LA-82, similar to LA-80, but with a different substitution pattern on the polycyclic aromatic system. The linker and terminal groups are identical to those in LA-80.

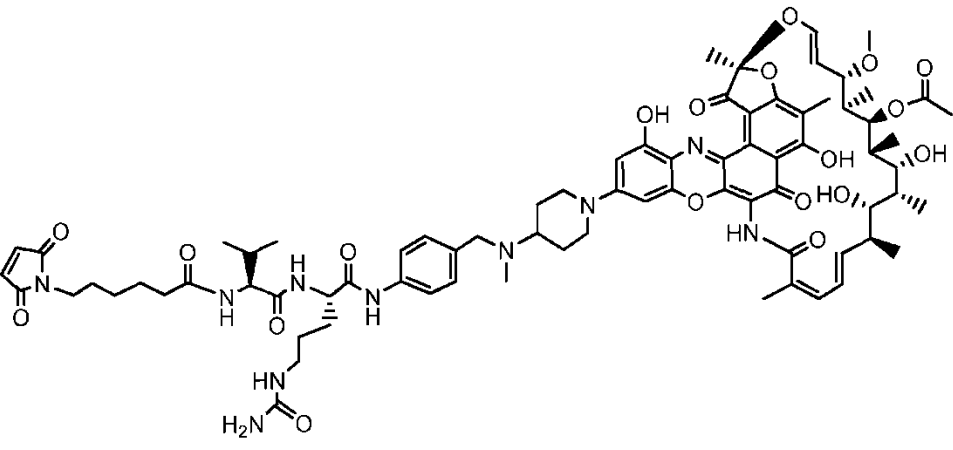
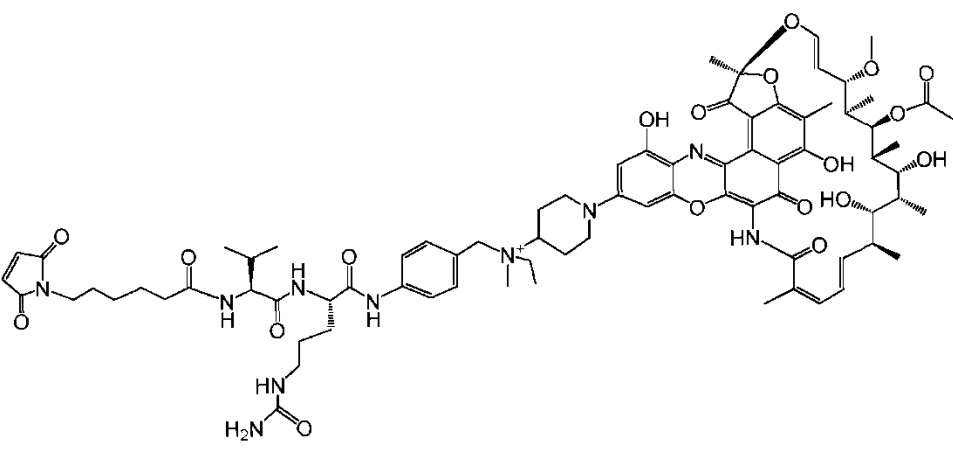
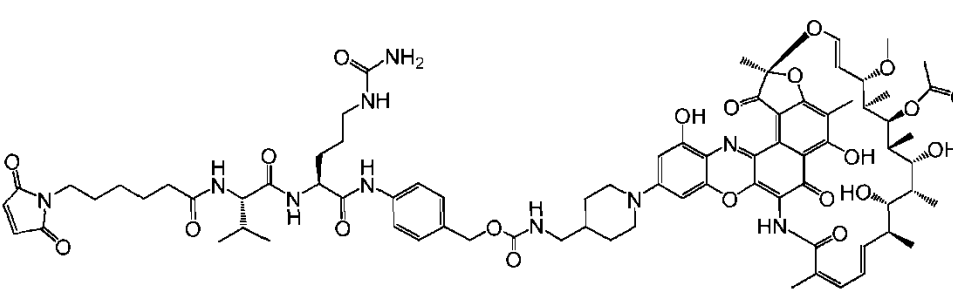
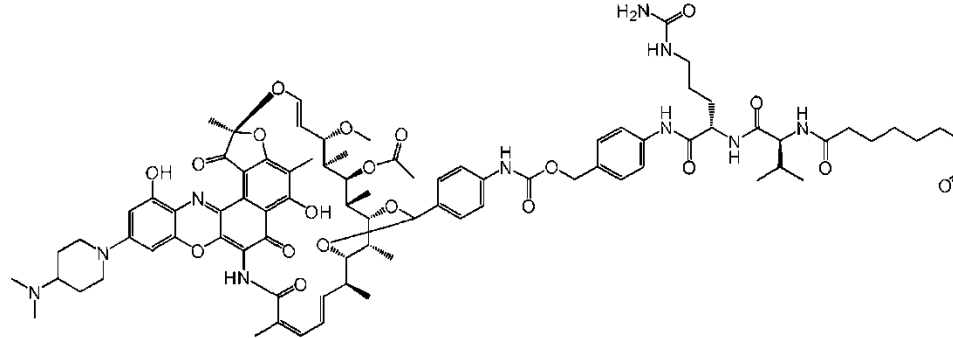
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-83	
LA-84	
LA-85	

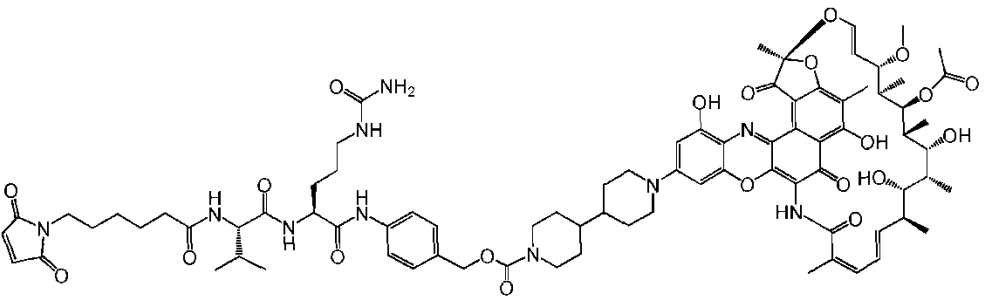
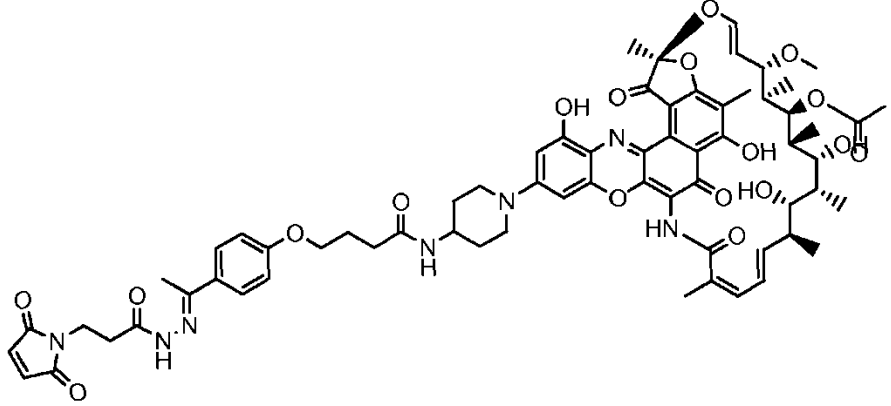
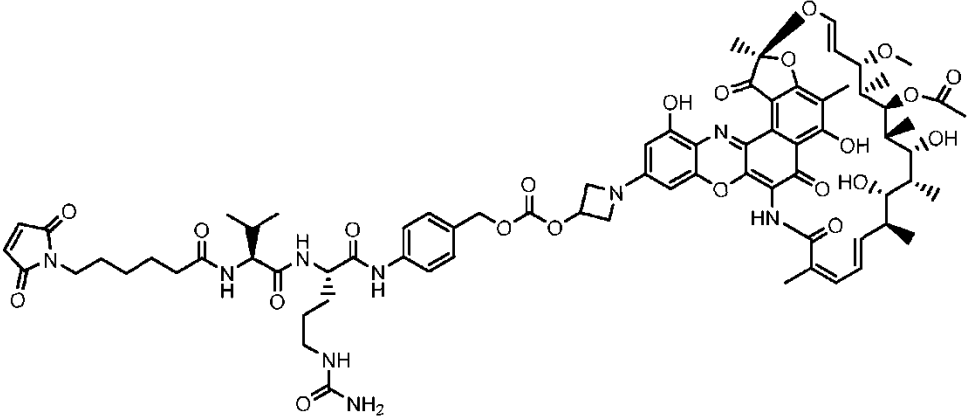
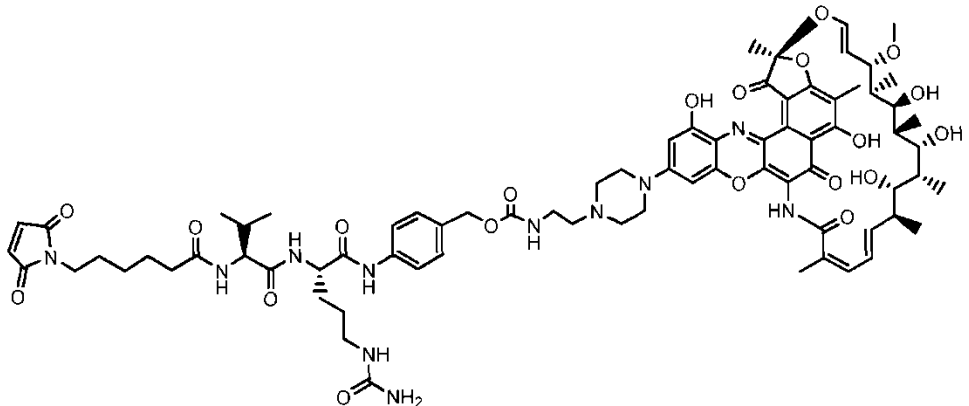
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-86	
LA-87	
LA-88	
LA-89	

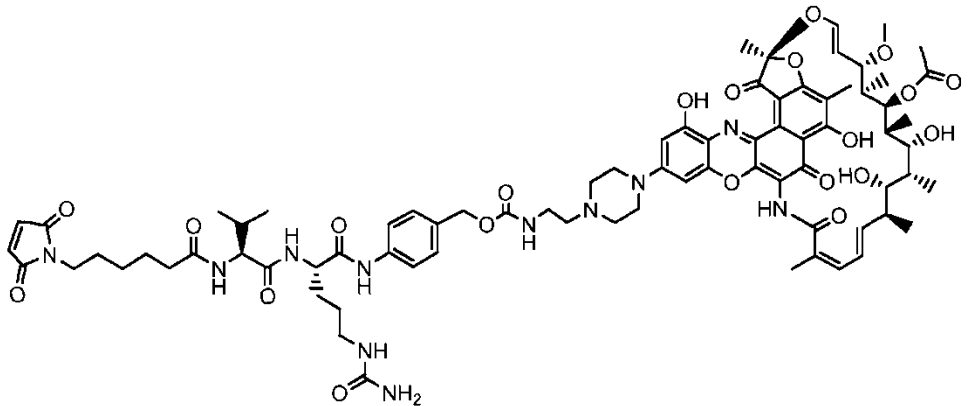
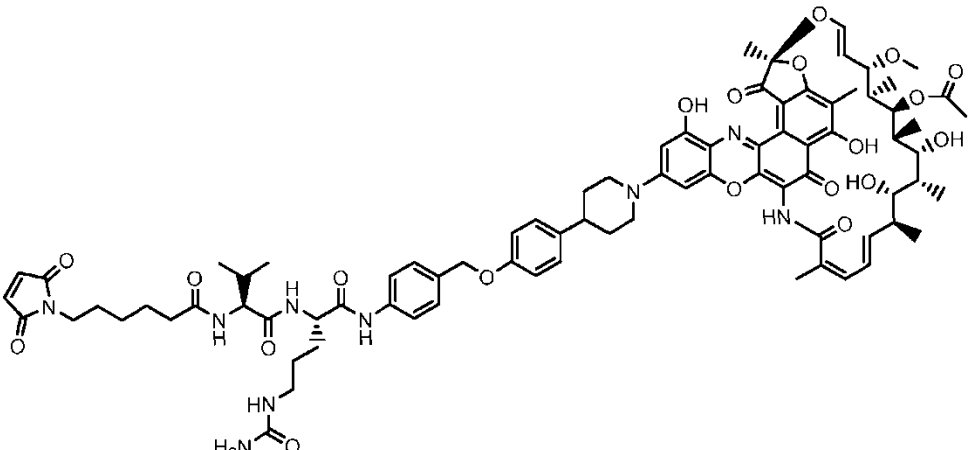
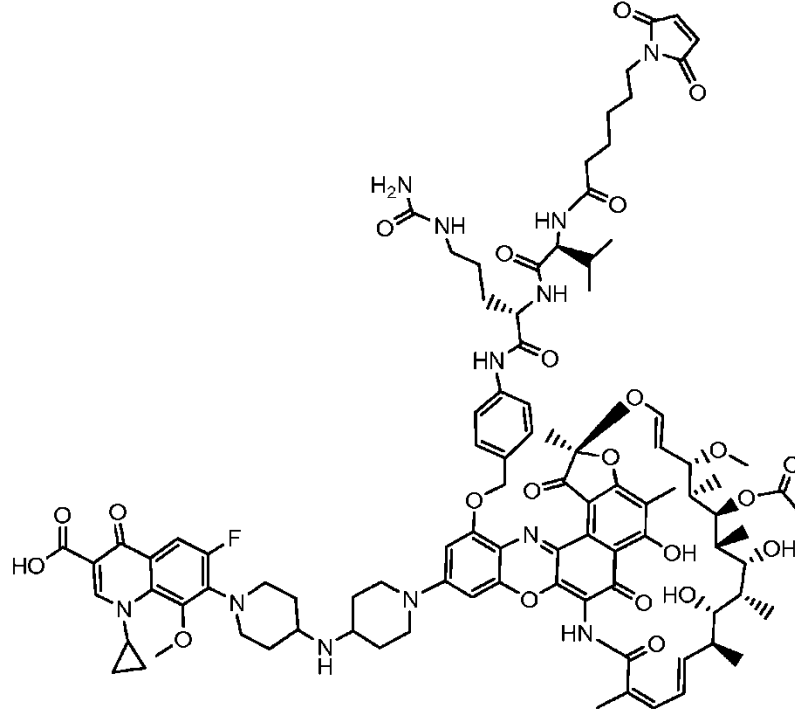
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-90	
LA-91	
LA-92	
LA-93	

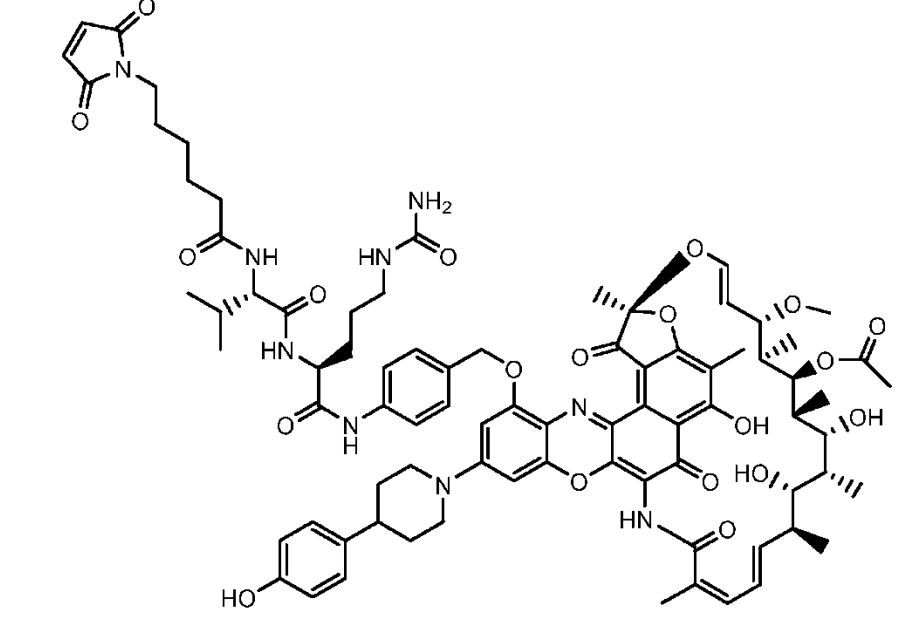
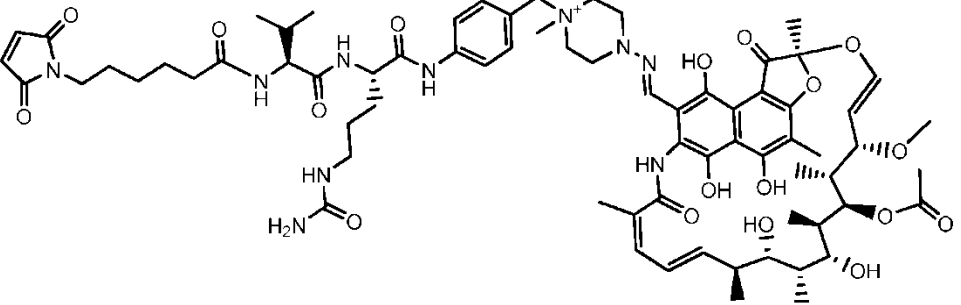
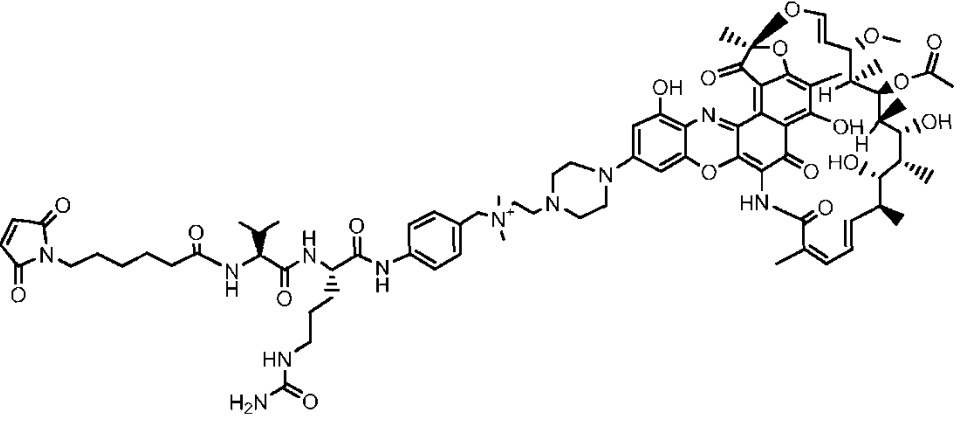
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-94	
LA-95	
LA-96	
LA-97	

(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-98	
LA-99	
LA-100	

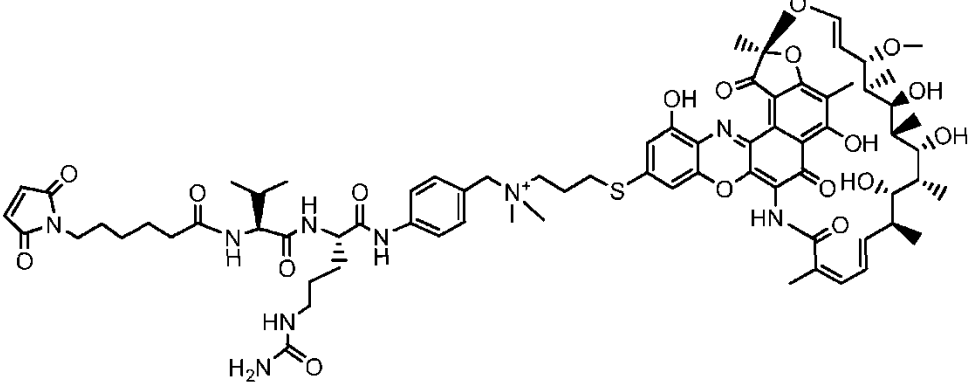
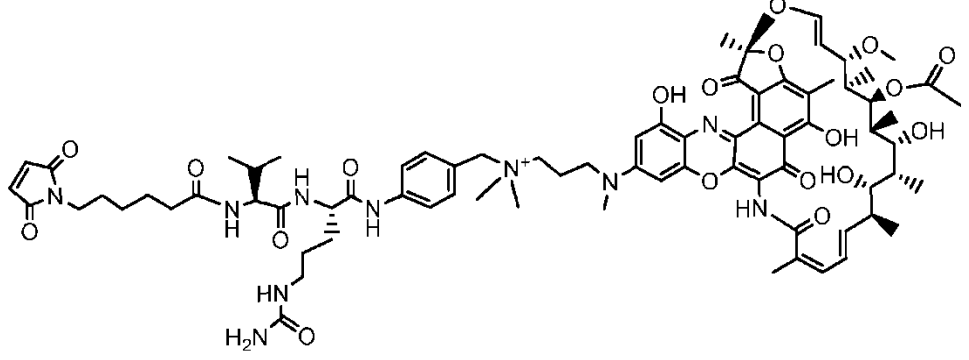
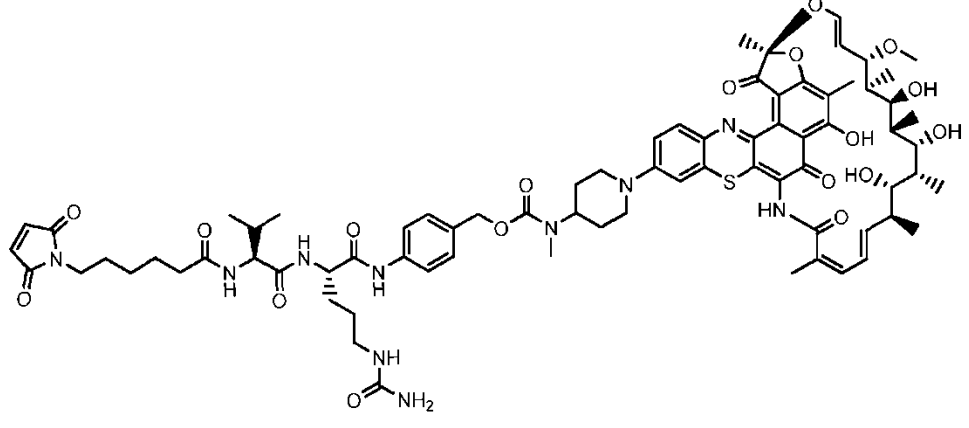
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-101	 The chemical structure of LA-101 features a complex polycyclic core with multiple hydroxyl groups and a fused heterocyclic system. It is substituted with a long chain containing a succinimide ring, an amide linkage, and a piperidine ring. The piperidine ring is further substituted with a 4-hydroxyphenyl group and a methoxy group. The structure is highly detailed with stereochemical indicators.
LA-102	 The chemical structure of LA-102 is similar to LA-101 but with a different substitution pattern. It features a polycyclic core with a long chain containing a succinimide ring, an amide linkage, and a piperidine ring. The piperidine ring is substituted with a 4-hydroxyphenyl group and a methoxy group. The structure is highly detailed with stereochemical indicators.
LA-103	 The chemical structure of LA-103 is similar to LA-101 but with a different substitution pattern. It features a polycyclic core with a long chain containing a succinimide ring, an amide linkage, and a piperidine ring. The piperidine ring is substituted with a 4-hydroxyphenyl group and a methoxy group. The structure is highly detailed with stereochemical indicators.

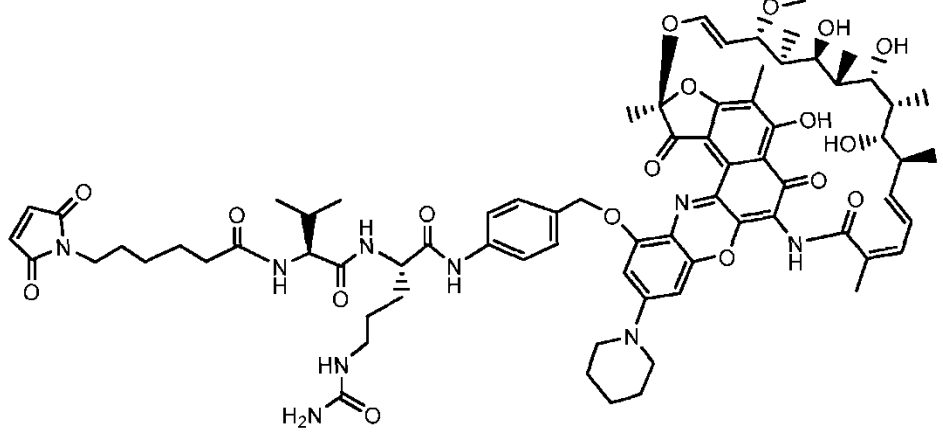
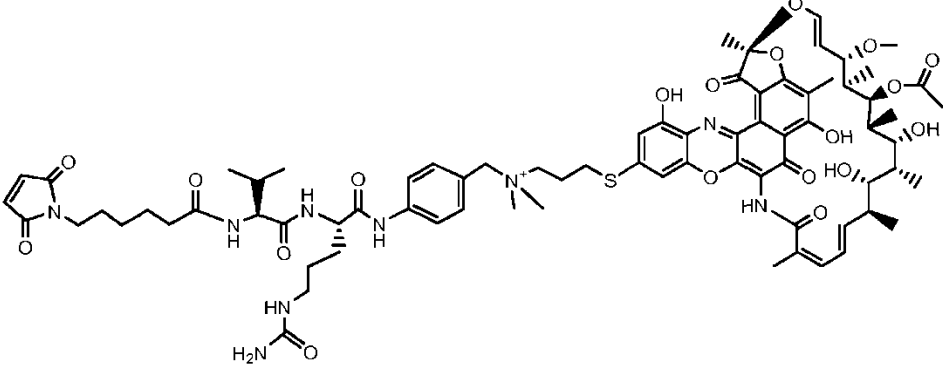
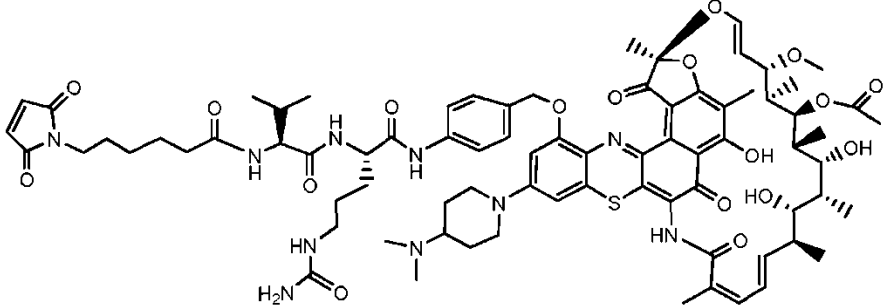
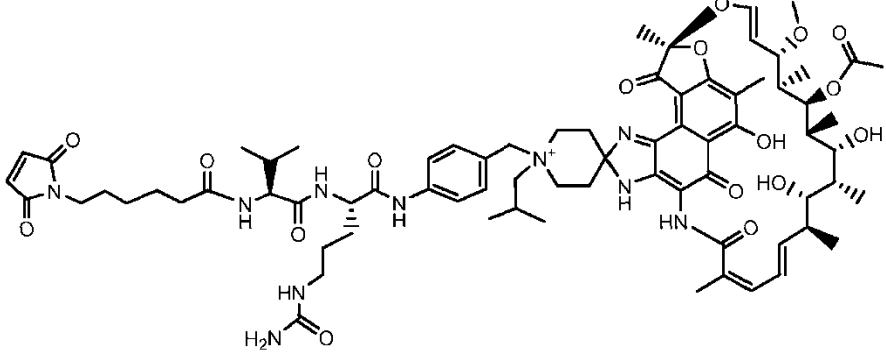
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-104	
LA-105	
LA-106	
LA-107	

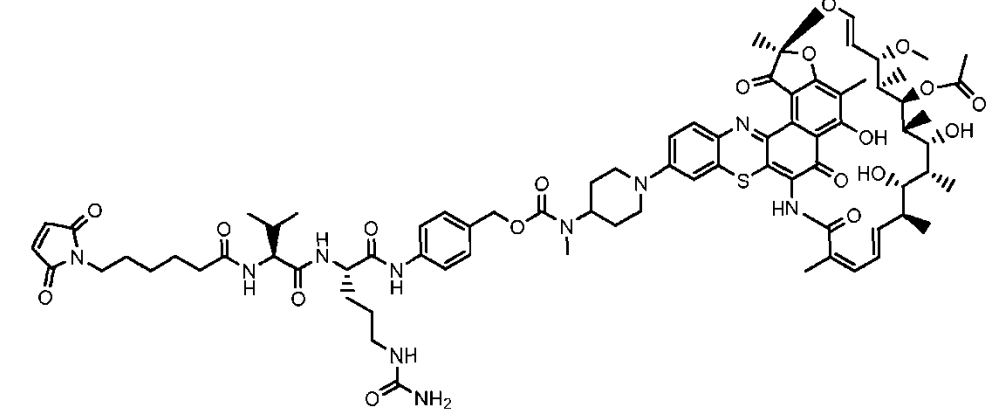
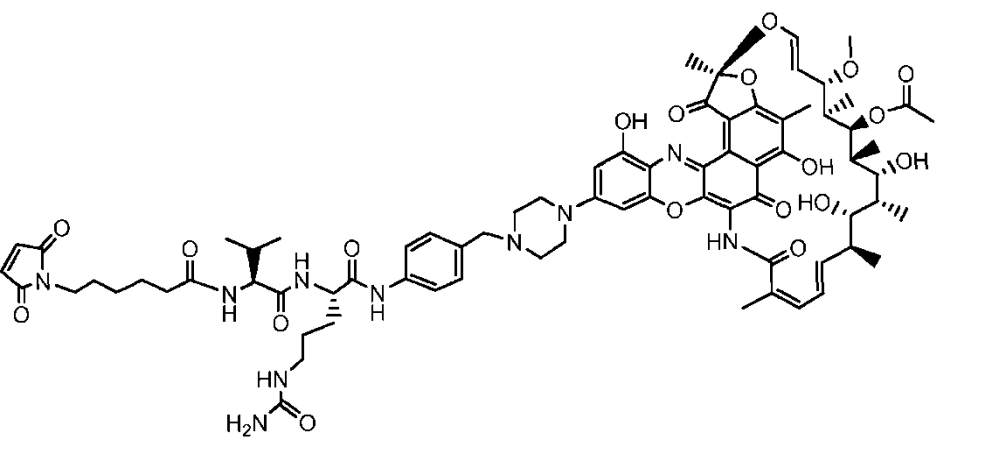
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-108	
LA-109	
LA-110	

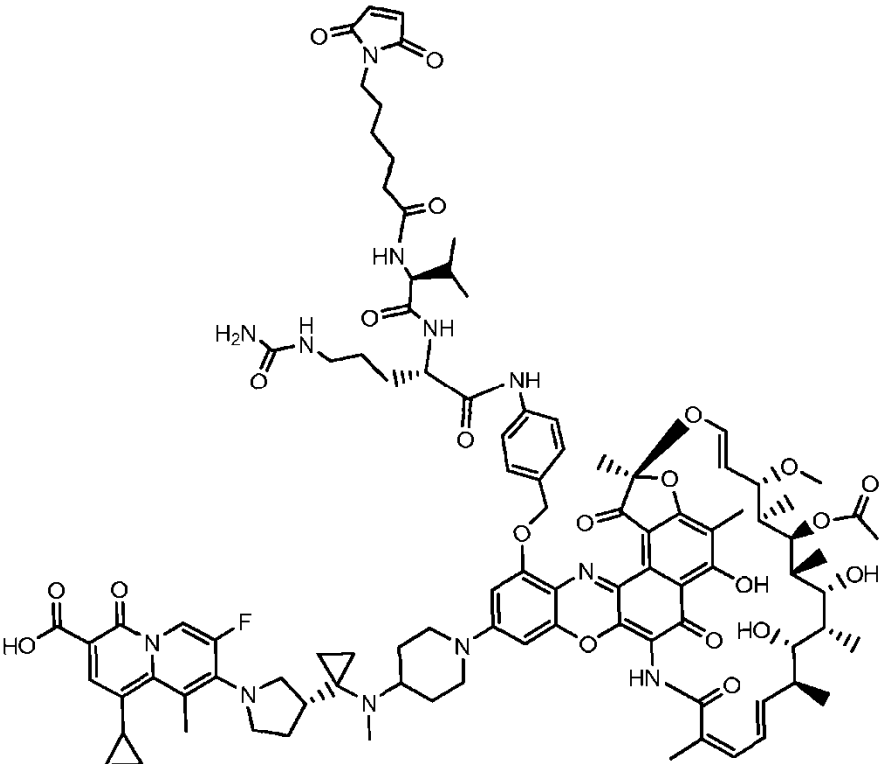
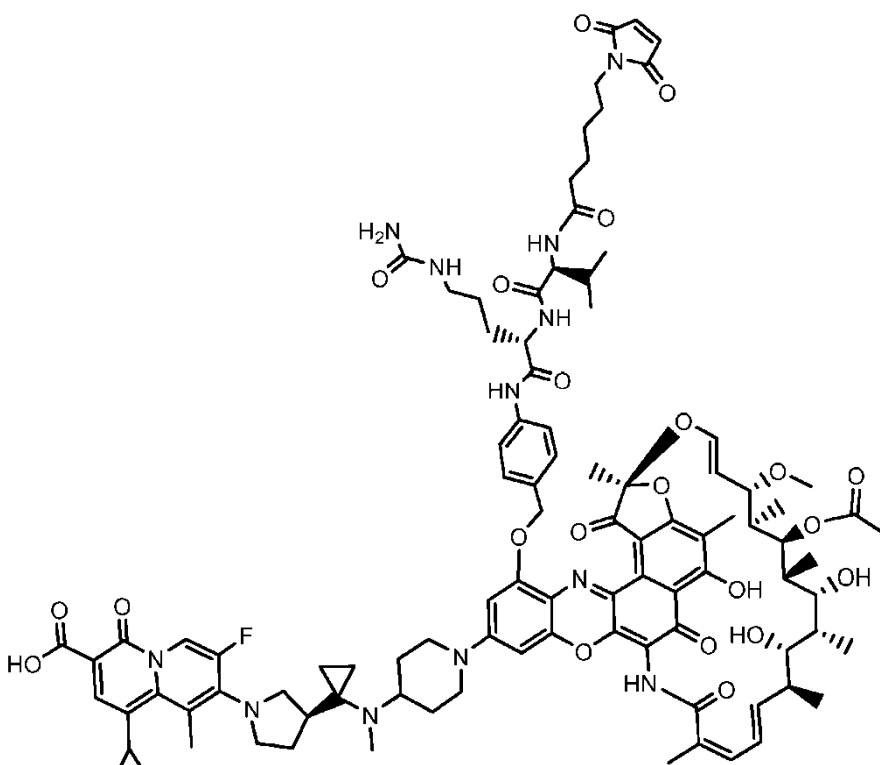
(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-111	
LA-112	
LA-113	
LA-114	

(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-115	 Chemical structure of LA-115: A complex molecule featuring a large, multi-ring system (likely a steroid or similar complex) on the right, connected via a piperazine ring to a benzyl group. This benzyl group is further connected to a chiral center (marked with a wedge bond) which is part of a chain containing a carboxamide group (NH-C(=O)-NH₂) and a long alkyl chain ending in a lactam ring (a five-membered ring with a carbonyl and a nitrogen atom).
LA-116	 Chemical structure of LA-116: A complex molecule similar to LA-115, featuring a large, multi-ring system on the right, connected via a piperazine ring to a benzyl group. This benzyl group is further connected to a chiral center (marked with a wedge bond) which is part of a chain containing a carboxamide group (NH-C(=O)-NH₂) and a long alkyl chain ending in a lactam ring (a five-membered ring with a carbonyl and a nitrogen atom).

(continuación)

N.º de LA	Estructura
LA-117	 Chemical structure of compound LA-117. The molecule features a complex polycyclic core, including a quinoline system and a substituted benzene ring. A carboxylic acid group is attached to the quinoline moiety. A side chain contains a fluorine atom, a cyclopropyl group, and a piperidine ring. The structure is further modified by a long chain containing a urea group, a secondary amine, and a terminal amide group. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.
LA-118	 Chemical structure of compound LA-118. This structure is identical to LA-117, showing the same complex polycyclic core, side chain with fluorine and cyclopropyl groups, and the long chain with urea and amide functionalities. Stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

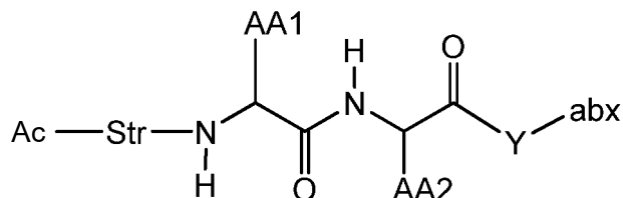
REALIZACIONES DE CONJUGADOS ANTICUERPO-ANTIBIÓTICO

El anticuerpo S4497 se enlazó a derivados de rifamicina denominados, en la Tabla 3, pipBOR y a otros a través de un enlazador peptídico escindible por proteasas. El enlazador está diseñado para ser escindido por proteasas lisosómicas, incluidas las catepsinas B, D y otras, que reconocen las unidades peptídicas, incluyendo el dipéptido Valina-Citrulina (val-cit, vc) (Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13:855-869). La generación del producto intermedio enlazador-antibiótico que consiste en el antibiótico y el enlazador MC-vc-PAB y otros, se describe en detalle en los Ejemplos 1-17. El enlazador está diseñado de tal manera que la escisión del enlace amida en el resto PAB separa el anticuerpo del antibiótico en un estado activo.

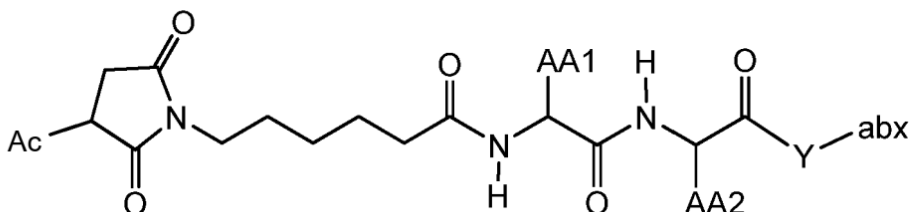
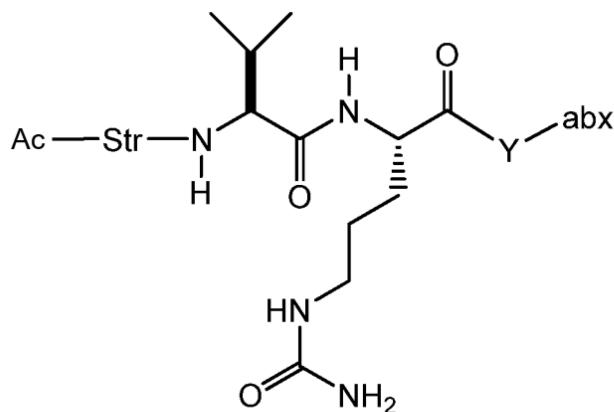
El AAC denominado S4497-dimetil-pipBOR es idéntico al AAC S4497-pipBOR, excepto por el grupo amino dimetilado en el antibiótico y el grupo oxicarbonilo en el enlazador.

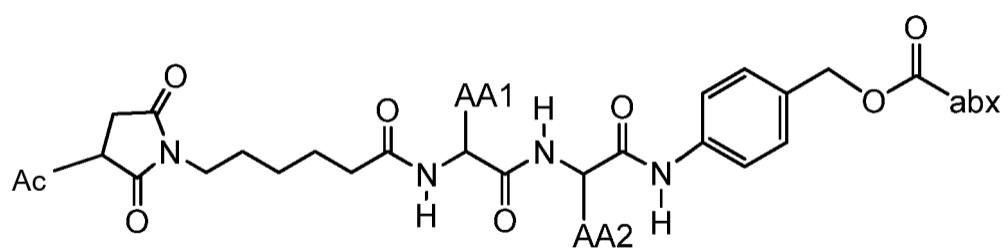
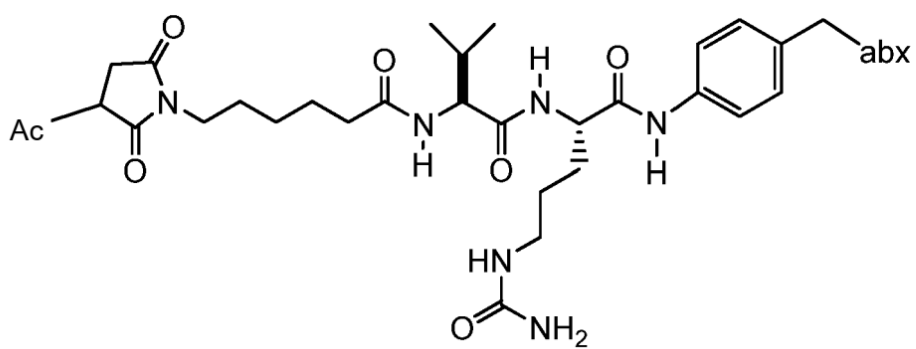
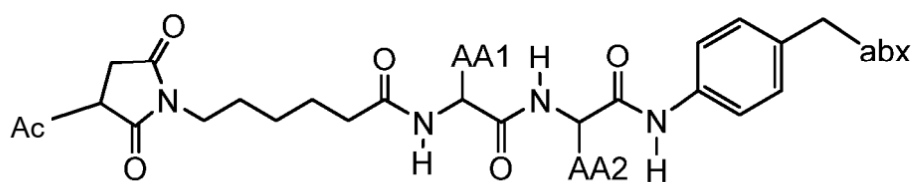
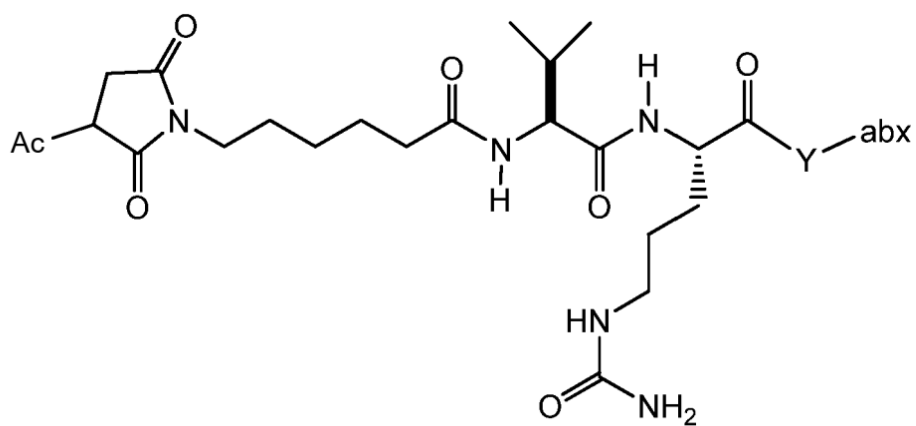
La Figura 5 muestra un posible mecanismo de activación del fármaco para conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC). El antibiótico activo (Ab) solo se libera después de la internalización del AAC dentro de las células de mamíferos. La porción Fab del anticuerpo en AAC se une a *S. aureus*, mientras que la porción Fc del AAC potencia la captación de la bacteria mediante la unión mediada por el receptor Fc a las células fagocíticas, incluidos los neutrófilos y los macrófagos. Después de la internalización en el fagolisosoma, el enlazador Val-Cit se escinde por proteasas lisosómicas que liberan el antibiótico activo dentro del fagolisosoma.

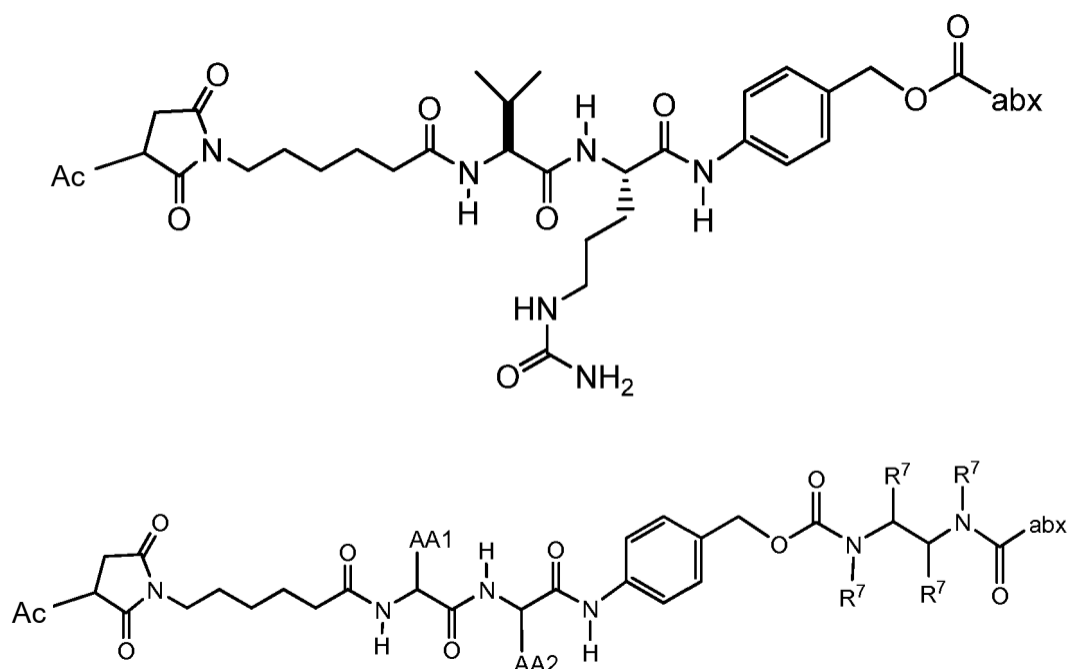
Una realización de los compuestos de conjugado anticuerpo-antibiótico (AAC) de la invención incluye los siguientes:



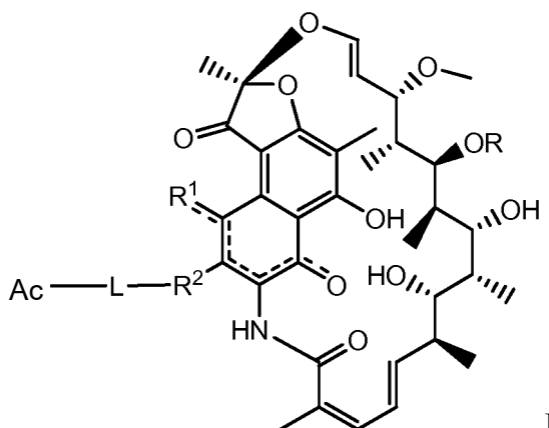
donde AA1 y AA2 se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácidos, incluyendo H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, -CHCH(CH₃)CH₃ y -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂; e incluyendo las fórmulas:.







Un ejemplo de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente:

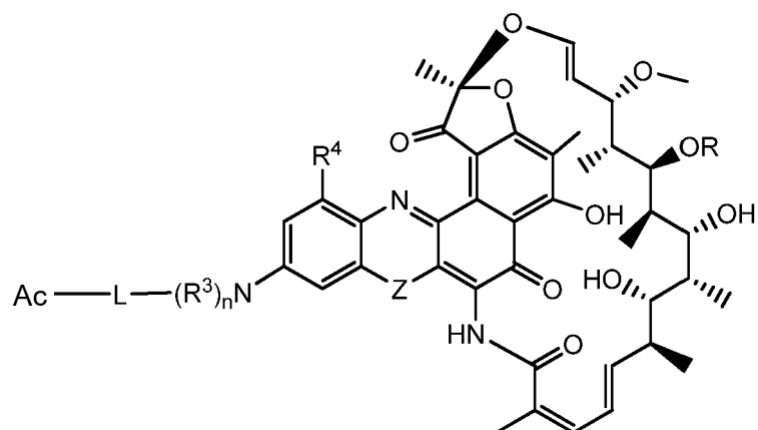


5

en donde:

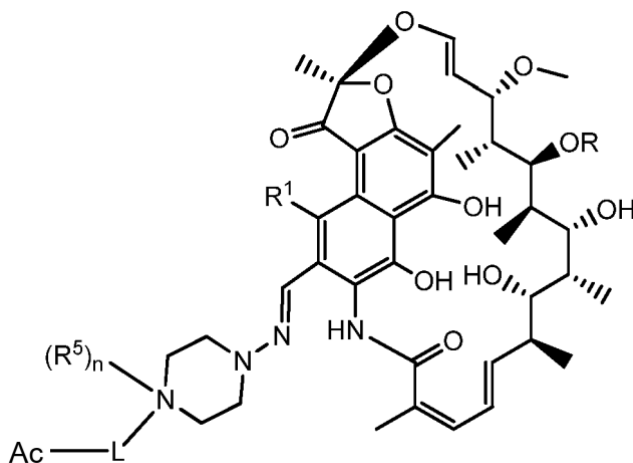
- 10 las líneas discontinuas indican un enlace opcional;
 R es H, alquilo C₁-C₁₂ o C(O)CH₃;
 R¹ es OH;
 R² es CH=N-(heterociclilo), en donde el heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más grupos
 seleccionados independientemente de C(O)CH₃, alquilo C₁-C₁₂, heteroarilo C₁-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-
 C₂₀ y carbociclilo C₃-C₁₂;
 15 o R¹ y R² forman un heteroarilo o heterociclilo de cinco o seis miembros fusionado y formando, opcionalmente,
 un anillo de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado, en donde el anillo
 de heteroarilo, heterociclilo, arilo, o carbociclilo de seis miembros espiro o fusionado se sustituye opcionalmente
 por H, F, Cl, Br, I, alquilo C₁-C₁₂ u OH;
 L es el enlazador peptídico fijado a R² o al heteroarilo o heterociclilo fusionado formado por R¹ y R²; y
 20 Ac es el anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared (WTA).

Un ejemplo de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente:



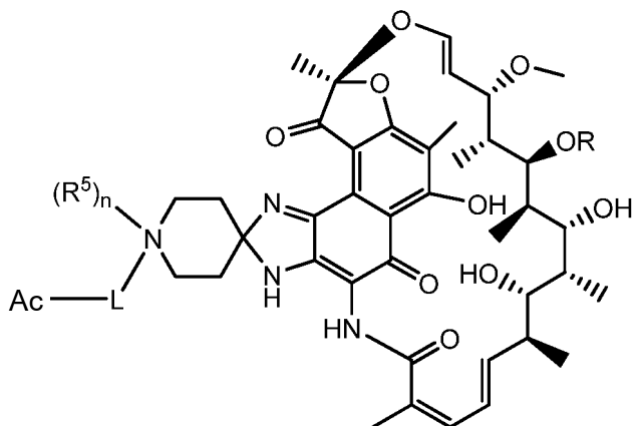
en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_{12} ; n es 1 o 2; R^4 se selecciona de H, F, Cl, Br, I, alquilo C_1-C_{12} y OH; y Z se selecciona de NH, N(alquilo C_1-C_{12}), O y S.

Un ejemplo de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente resto antibiótico de tipo rifampicina:



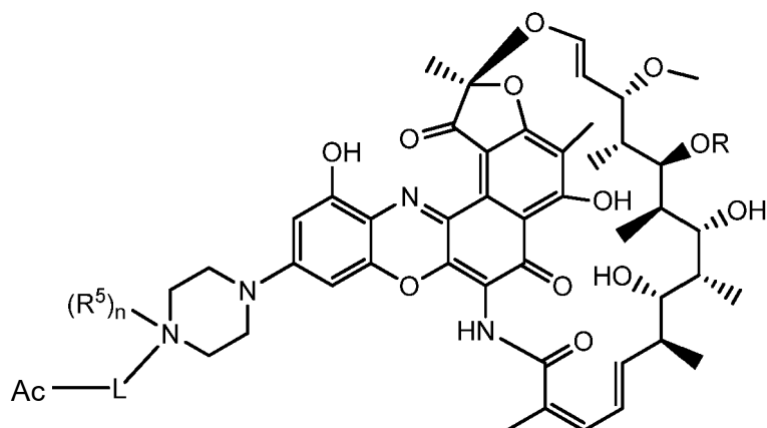
en donde R^5 se selecciona de H y alquilo C_1-C_{12} ; y n es 0 o 1.

Un ejemplo de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente resto antibiótico de tipo rifabutina:



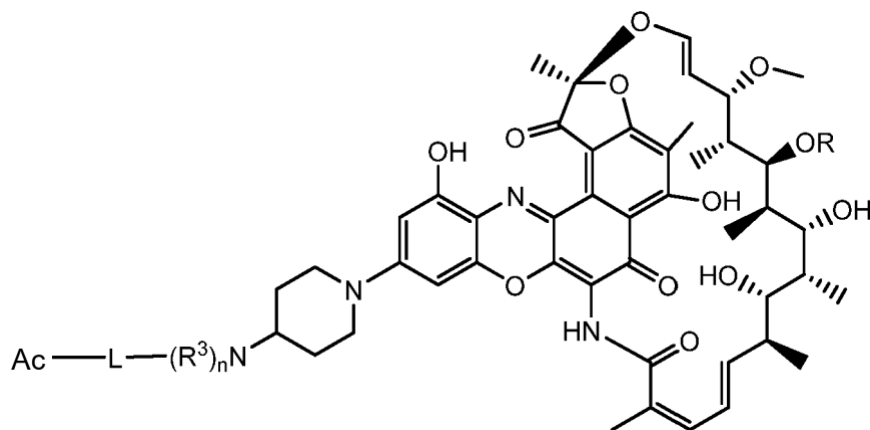
en donde R^5 se selecciona de H y alquilo C_1-C_{12} ; y n es 0 o 1.

Una realización de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente resto antibiótico de tipo rifalazil:



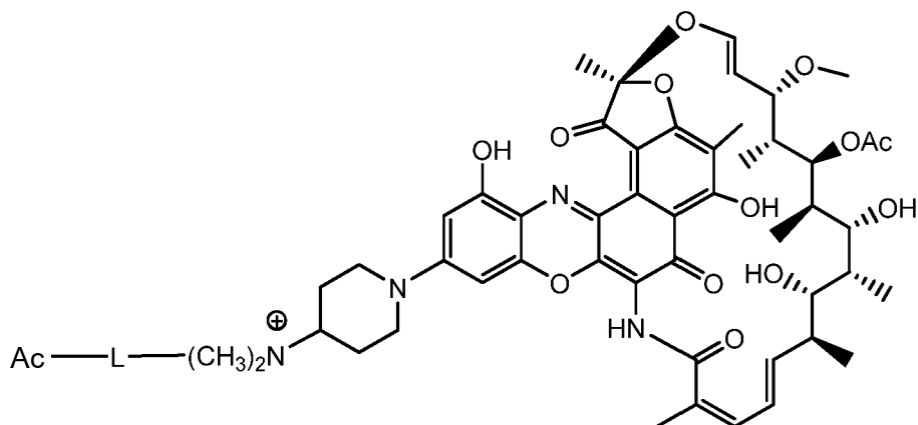
en donde R^5 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y n es 0 o 1.

- 5 Una realización de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente resto antibiótico de tipo pipBOR:

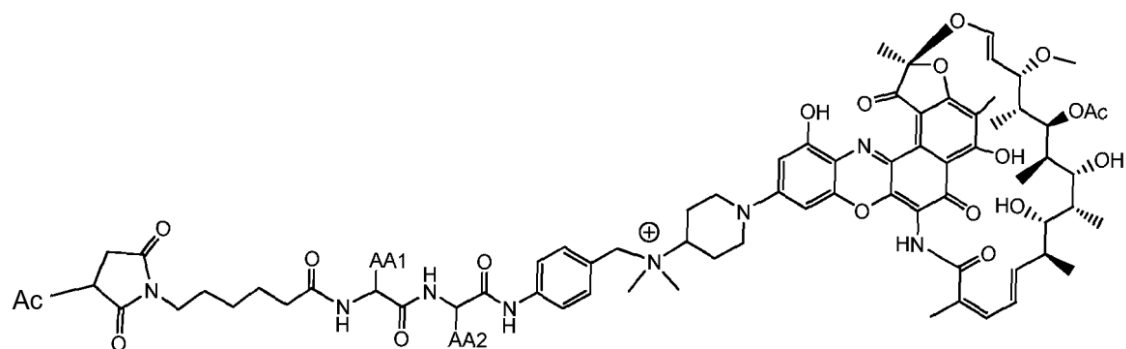
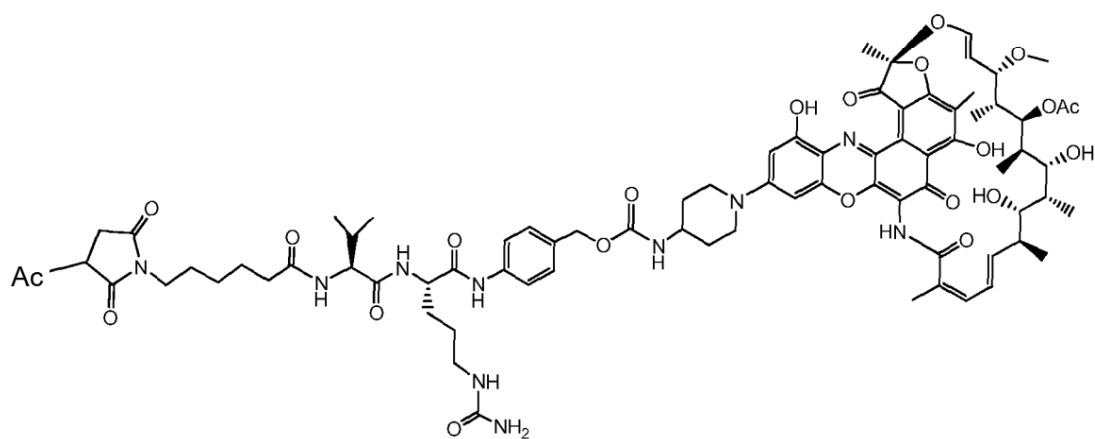
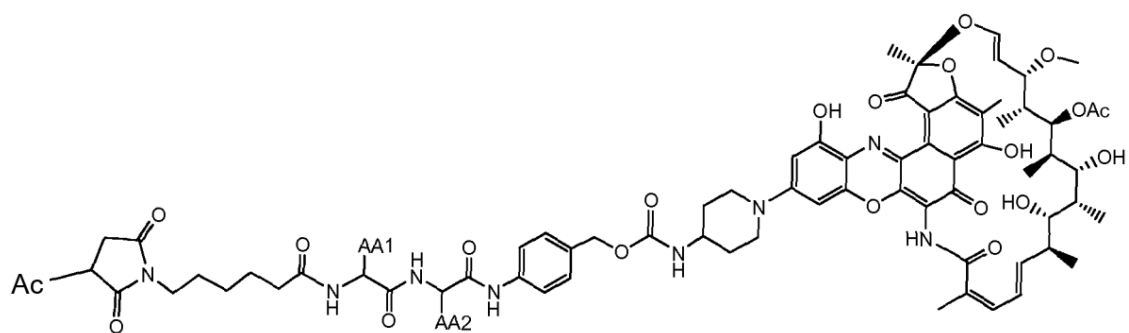


10 en donde R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y n es 1 o 2.

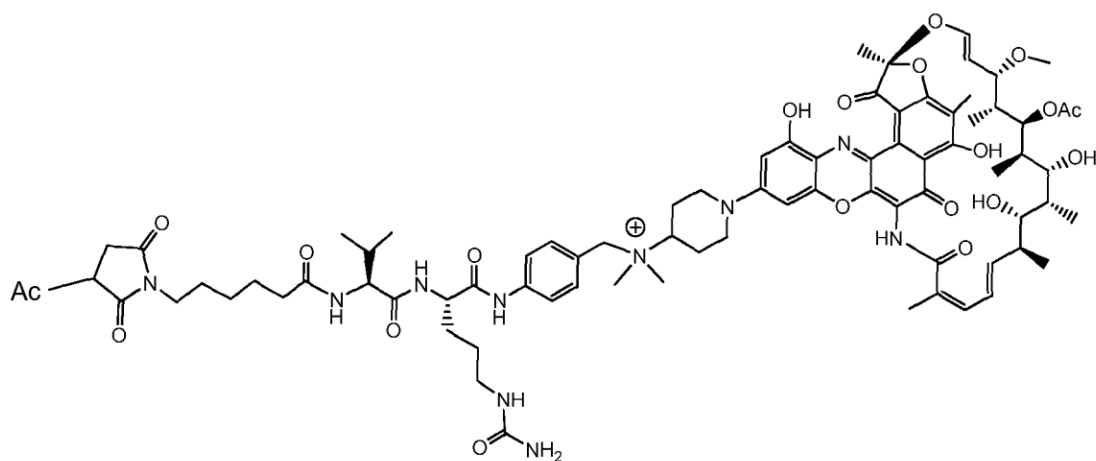
Una realización de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluye el siguiente:



Otras realizaciones de los compuestos conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención incluyen los siguientes:



5 y



CARGA ANTIBIÓTICA DE AAC

La carga antibiótica está representada por p, el número promedio de restos antibióticos (abx) por anticuerpo en una molécula de Fórmula I. La carga antibiótica puede variar de 1 a 20 restos antibióticos (D) por anticuerpo. El AAC de Fórmula I incluye colecciones o un conjunto de anticuerpos conjugados con una gama de restos antibióticos, de 1 a 20. El número promedio de restos antibióticos por anticuerpo en preparaciones de AAC a partir de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de AAC en función de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de AAC homogéneos donde p es un determinado valor a partir de AAC con otras cargas antibióticas se puede conseguir por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados anticuerpo-antibiótico, p puede estar limitado por el número de sitios de fijación en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión está en un tiol de cisteína, como en las realizaciones a modo de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o algunos grupos tiol de la cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. En determinadas realizaciones, una mayor carga antibiótica, p. ej. $p > 5$, puede causar la agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de determinados conjugados anticuerpo-antibiótico. En determinadas realizaciones, la carga antibiótica para un AAC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 2 a aproximadamente 4; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; aproximadamente 4; o aproximadamente 2.

En determinadas realizaciones, se conjugan menos que el máximo teórico de restos antibióticos con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, restos lisina que no reaccionan con el producto intermedio antibiótico-enlazador o con el reactivo enlazador, tal como se analiza a continuación. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de la cisteínas libres y reactivos que pueden estar enlazados a un resto antibiótico; de hecho, la mayoría de los restos tiol de las cisteínas en los anticuerpos existen como puentes disulfuro. En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditioneol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de cisteínas reactivos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína.

La carga (relación antibiótico/anticuerpo, "AAR") de un AAC puede controlarse de diferentes maneras, por ejemplo, (i) limitando el exceso molar del producto intermedio antibiótico-enlazador o del reactivo enlazador con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación y (iii) limitando o reduciendo parcialmente las condiciones reductoras para la modificación del tiol de la cisteína.

Se deberá entender que cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un producto intermedio antibiótico-enlazador o con un reactivo enlazador seguido por el reactivo del resto antibiótico, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos AAC con una distribución de uno o más restos antibióticos unidos a un anticuerpo. El número promedio de antibióticos por anticuerpo se puede calcular a partir de la mezcla mediante un ensayo de anticuerpos ELISA doble, que es específico para el anticuerpo y específico para el antibiótico. Las moléculas AAC individuales pueden identificarse en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba (véase, por ejemplo, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Resumen N.º 624, American Association for Cancer Research, Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Resumen N.º 627, American Association for Cancer Research, Reunión Anual de 2004, 27-31 de marzo de 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). En determinadas realizaciones, se puede aislar un AAC homogéneo con un único valor de carga de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía. Los anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína de la invención permiten preparaciones más homogéneas ya que el sitio reactivo en el anticuerpo se limita principalmente al tiol de la cisteína modificada por ingeniería. En una realización, el número promedio de restos antibióticos por anticuerpo está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20. En algunas realizaciones, el intervalo se selecciona y controla de aproximadamente 1 a 4.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE CONJUGADOS ANTICUERPO-ANTIBIÓTICO

Un AAC de Fórmula I puede prepararse por varias vías empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ac-L a través de un enlace covalente, seguida de la reacción con un resto antibiótico (abx); y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto antibiótico con un reactivo enlazador bivalente, para formar L-abx, a través de un enlace covalente, seguida de la reacción con un grupo nucleófilo de un anticuerpo. En el documento US 7498298 se describen métodos a modo de ejemplo para preparar un AAC de Fórmula I a través de la última vía.

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcar en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para su conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól) o tricarboniletilfosfina (TCEP), de modo que el anticuerpo se reduce total o parcialmente. Por tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en los anticuerpos mediante la modificación de restos de lisina, por ejemplo, haciendo reaccionar restos de lisina con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en un anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos variantes que comprenden uno o más restos de aminoácido de cisteína no nativos).

Los conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención también pueden producirse por reacción entre un grupo electrófilo en un anticuerpo, tal como un grupo carbonilo aldehído o cetona, con un grupo nucleófilo en un reactivo enlazador o antibiótico. Los grupos nucleófilos útiles en un reactivo enlazador incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato y arilhidrazida. En una realización, un anticuerpo se modifica para introducir restos electrófilos que son capaces de reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o antibiótico. En otra realización, los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o restos antibióticos. Los grupos de bases de Schiff, iminas, resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con bien galactosa oxidasa o metaperyodato de sodio puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en el anticuerpo que pueden reaccionar con grupos apropiados en el antibiótico (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, los anticuerpos que contienen restos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperyodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Dicho aldehído se puede hacer reaccionar con un resto antibiótico o nucleófilo enlazador.

Los grupos nucleófilos en un resto antibiótico incluyen, pero sin limitación: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

Los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) en la Tabla 3 se prepararon mediante la conjugación de los anticuerpos anti-WTA descritos y los productos intermedios enlazador-antibiótico de la Tabla 2 y de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 24. Los AAC se probaron para determinar la eficacia mediante ensayo de macrófagos *in vitro* (Ejemplo 18) modelo de riñón de ratón *in vivo* (Ejemplo 19).

Tabla 3 Conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC)

N.º de AAC	Fórmula de AAC	N.º de LA enlazador-abx (Tabla 2)	AAR *
AAC-101	tio-trastuzumab HC A118C-MC-vc-PAB-(dimetil-pipBOR)	LA-54	1,8
AAC-102	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	1,9
AAC-103	tio-S4497-HC-A114C-MC-fk-PABC-(pipBOR)	LA-52	1,0
AAC-104	tio-S4497-HC-A114C-MP-vc-PABC-(pipBOR)	LA-53	1,8
AAC-105	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,73 1,9
AAC-106	tio-S4462-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	
AAC-107	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(monometilpip, desacetilBOR)	LA-55	1,75
AAC-108	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(monometilpipBOR)	LA-56	1,5

(continuación)

N.º de AAC	Fórmula de AAC	N.º de LA enlazador-abx (Tabla 2)	AAR *
AAC-109	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pip, desacetilBOR)	LA-57	1,9
AAC-110	tio-hu-anti gD 5B5-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,94
AAC-111	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(rifabutina)	LA-58	1,6
AAC-112	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetil-pipBOR)	LA-54	1,65
AAC-113	tio-S4497 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,6
AAC-114	tio-S4462 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,8
AAC-115	tio-Tmab LC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,7
AAC-116	tio-S7578-MC-vc-PAB-(dimetil-pipBOR)	LA-54	tbd
AAC-117	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	tbd
AAC-118	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(oxiBOR)	LA-60	1,8
AAC-119	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpip, desacetilBOR)	LA-61	1,7
AAC-120	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBTR)	LA-62	1,8
AAC-121	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperaz, desacetilBTR)	LA-63	1,8
AAC-122	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-123	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-124	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBTR)	LA-62	1,8
AAC-125	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperaz, desacetilBOR)	LA-64	0,9
AAC-126	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBOR)	LA-65	1,7
AAC-127	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-66	1,7
AAC-128	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(metilpiperazBOR)	LA-67	1,9
AAC-129	tio-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,6
AAC-130	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(oxi, isopropilpipBOR)	LA-68	1,8
AAC-131	tio-S4497-HC-A118C-MC-tpm-cit-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-69	1,8
AAC-132	tio-S4497 HC MC-GPIImLFF-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 129)	LA-69	1,3
AAC-133	tio-S4497 HC MC-GPILFF-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 130)	LA-70	1,2
AAC-134	tio-S4497 HC MC-val-cit-phe-(pipBOR)	LA-71	1,7
AAC-135	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-136	tio-S4497.v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	2
AAC-137	tio-S4497.v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	tbd
AAC-138	tio-S4497 HC WT v8, LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-139	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,8

(continuación)

N.º de AAC	Fórmula de AAC	N.º de LA enlazador-abx (Tabla 2)	AAR *
AAC-140	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1,6
AAC-141	tio-S6078-HCA114C-LCWT-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,6
AAC-142	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,7
AAC-143	tio-S4497 HC-MP-GGAFA-PAB-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 131)	LA-87	1,55
AAC-144	tio-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(fenilpipBOR)	LA-72	1,7
AAC-145	tio-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(dimetilBTR)	LA-73	1,7
AAC-146	tio-Tmab HC A118C-MP-GGAFA-PABC-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 131)	LA-87	1,3
AAC-147	tio-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-74	1,9
AAC-148	tio-S4497v1 HC-MC-vc-PABC-(pipBTR)	LA-75	1,9
AAC-149	tio-S4497v1 HC-MC-vc-PAB-(metilpiperaz, desacetilBOR)	LA-76	2
AAC-150	tio-S4497v1 HC-MC-vc-(fenilpipBOR)	LA-77	1,8
AAC-151	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(3-dimetilaminopirrolBOR)	LA-78	tbd
AAC-152	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(O-metil, dimetilpipBOR)	LA-79	1,7
AAC-153	tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(fenilpipBOR)	LA-80	tbd
AAC-154	tio-S4497v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,8
AAC-155	tio-S7578-HC WT-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-156	tio-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(3-dimetilaminopirrolBOR)	LA-78	tbd
AAC-157	tio-S4497v8-LC-MC-vc-PABC-(desacetil, pipBTR)	LA-81	2,2
AAC-158	tio-S4497v8-LC-MC-vc-(desacetil, fenilpipBOR)	LA-82	-
AAC-159	tio-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(dimetilamino, metilaminoetilBTR)	LA-83	2,2
AAC-160	tio-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(metilpiperazBTR)	LA-84	tbd
AAC-161	tio-S4497v8-LC-MC-vc-(fenilpipBOR)	LA-85	tbd
AAC-162	tio-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA-86	tbd
AAC-163	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-LAFG-PAB-(dimetilamino-3-pirrolBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128)	LA-88	2,2
AAC-164	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABpirazolo(pipBOR)	LA-89	tbd
AAC-165	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(monometilaminopipBOR)	LA-90	1,3
AAC-166	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,8
AAC-167	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(metil, etilaminopipBOR)	LA-91	2,0
AAC-168	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(aminometilpipBOR)	LA-92	1,6
AAC-169	tio-S4497 WT (V8), LC V205C-MC-vc-PABC-C21, C23-fenilacetal-(dimetilaminopipBOR)	LA-93	1,6
AAC-170	tio-S4497 WT (V8), LC V205C-MC-vc-PABCpip-(pipBOR)	LA-94	1,4

(continuación)

N.º de AAC	Fórmula de AAC	N.º de LA enlazador-abx (Tabla 2)	AAR *
AAC-171	tio-S6078 v4 HC-Cys LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	3,9
AAC-172	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	3,9
AAC-173	tio-S6078 v4 HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	2,0
AAC-174	tio-S6078.v4.HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1,8
AAC-175	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MP-hidrazida PP-(pipBOR)	LA-95	2,0
AAC-176	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(azetidiniBOR)	LA-96	tbd
AAC-177	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(etilpiperazino, desacetilBOR)	LA-97	1,6
AAC-178	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(etilaminopiperazinoBOR)	LA-98	1,7
AAC-179	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABfenil-(pipBOR)	LA-99	1,9
AAC-180	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(fluoroquinolona, oxiBOR)	LA-100	1,9
AAC-181	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(fenoxipip, oxiBOR)	LA-101	1,6
AAC-182	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA-86	4,0
AAC-183	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PABC-(desacetil, pipBTR)	LA-81	3,8
AAC-184	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(oxi, isopropilpipBOR)	LA-68	tbd
AAC-185	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(metilrifampicina)	LA-102	tbd
AAC-186	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-187	tio-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	3,8
AAC-188	tio-S6078 v4 HC-WT, LCCYS-MC-vc-PAB-(oxi, isopropilpipBOR)	LA-68	1,6
AAC-189	tio-S6078 v4 HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(metilrifampicina)	LA-102	1,8
AAC-190	tio-S7578-HC-WT-LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-191	tio-S4497-v8-LC-V205C-MC-vc-PAB- (dimetilaminoetilpiperazinoBOR)	LA-103	1,7
AAC-192	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-193	tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128)	LA-104	1,8
AAC-194	tio-S6078 v4 HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1,8
AAC-195	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-C21, C23-anilinoacetal- (dimetilaminopipBOR)	LA-105	2,0
AAC-196	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-anilino-(trimetilamonio-pip, oxiBOR)	LA-106	2,1
AAC-197	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilamonio, fluoropipBOR)	LA-107	2,0
AAC-198	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilamonio, tiopropil, desacetil BOR)	LA-108	1,9

(continuación)

N.º de AAC	Fórmula de AAC	N.º de LA enlazador-abx (Tabla 2)	AAR *
AAC-199	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilamonio, metilaminopropilBOR)	LA-109	1,8
AAC-200	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,0
AAC-201	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PABC-(metilaminopip, desacetil BOR)	LA-110	1,9
AAC-202	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(oxi, pip, desacetil BOR)	LA-111	1,9
AAC-203	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(metilrifampicina)	LA-102	1,8
AAC-204	tio-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(dimetilamonio, tiopropil BOR)	LA-112	2,0
AAC-205	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(oxi, dimetilaminopipBOR)	LA-113	1,8
AAC-206	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(N-isobutilrifabutina)	LA-114	1,9
AAC-207	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(metilrifampicina)	LA-102	1,8
AAC-208	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilamonio, fluoropipBOR)	LA-107	1,8
AAC-209	tio-S4497-v8-LC cys-D10-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-210	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PABC-(monometilpipBTR)	LA-115	1,5
AAC-211	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(piperazinoBOR)	LA-116	tbd
AAC-212	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(R-fluoroquinolona, oxiBOR)	LA-117	tbd
AAC-213	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(S-fluoroquinolona, oxiBOR)	LA-118	tbd
AAC-214	tio-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(dimetilpip, desacetilBOR)	LA-61	2,0
AAC-215	tio-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128)	LA-104	1,6
AAC-216	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1,9
AAC-217	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(monometilaminopipBOR)	LA-90	1,8
AAC-218	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-219	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(piperazBOR)	LA-65	1,9
AAC-220	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(piperazinoBOR)	LA-116	tbd
AAC-221	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(metilpiperaz BOR)	LA-67	tbd
AAC-222	tio-S4497 LC v8 -MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128)	LA-104	tbd
* AAR = relación promedio antibiótico/anticuerpo Tipo silvestre ("WT", por sus sigls en inglés"), anticuerpo mutante modificado por ingeniería con cisteína ("tio"), cadena ligera ("LC"), cadena pesada ("HC"), 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit" o "vc"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobencilo ("PAB") y p-aminobenciloxicarbonilo ("PABC") tbd = por determinar HC-A114C (Kabat) = HC-A118C (EU)			

ANÁLISIS *IN VITRO* QUE DEMUESTRA QUE LOS AAC DESTRUYEN MRSA INTRACELULAR

Los experimentos *in vitro* confirman que el AAC libera antibiótico activo solo después de que el enlazador entre el

anticuerpo y el antibiótico sea escindido por una enzima apropiada tal como catepsina B. MRSA se cultivó durante la noche en medios de crecimiento bacteriano normales y hasta 10 µg/ml de AAC. La incubación de MRSA con los AAC S4497-pipBOR o S4497-dimetil-pipBOR no dio como resultado la inhibición del crecimiento bacteriano a menos que los AAC se trataran previamente con catepsina B para liberar el antibiótico activo. Un ensayo *in vitro* que utiliza macrófagos peritoneales murinos confirmó que AAC libera antibiótico activo y destruye MRSA dentro de las células fagocíticas (Ejemplo 18). Un AAC que comprende el anticuerpo rF1, que se une a una familia de proteínas asociadas a la pared celular se conjugó con un derivado de rifamicina. Se trató *S. aureus* (cepa Newman) con varias dosis de rF1-AAC o con dosis equivalentes de cualquier anticuerpo solo, rifampicina sola o una mezcla de anticuerpo y rifampicina libre para permitir la unión del anticuerpo a las bacterias (opsonización) y después de 1 hora de incubación se proporcionaron las bacterias opsonizadas a los macrófagos (Figura 7A).

La figura 7A muestra un ensayo de macrófagos *in vitro* que demuestra que AAC destruye MRSA intracelular. Se incubó *S. aureus* (Newman) con el anticuerpo rF1 solo, rifampicina libre sola, una mezcla simple del anticuerpo rF1 más rifampicina libre combinados en la misma proporción de anticuerpo a antibiótico encontrada en el AAC o en el rF1-AAC durante 1 hora y se añadió a los macrófagos murinos. Los macrófagos se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de completar la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después de la infección mediante siembra en placa.

Los macrófagos se infectaron durante 2 horas y la infección se eliminó y se reemplazó con medios que contenían gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante que no se hubiera captado por los macrófagos. Después de 2 días, los macrófagos se lisaron y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes sembrando en placas sobre placas de agar. El análisis reveló que el tratamiento con el AAC dio como resultado una reducción de más de 100 veces en el número de bacterias intracelulares en comparación con el tratamiento con una mezcla simple del anticuerpo rF1 más rifampicina libre combinados en la misma proporción de anticuerpo a antibiótico que se encuentra en el AAC (Figura 7A).

MRSA es capaz de invadir varios tipos de células no fagocíticas, incluidos los osteoblastos y diferentes tipos de células epiteliales y endoteliales (Garzoni y Kelly, (2008) Trends in Microbiology). MRSA puede infectar una línea celular de osteoblastos (MG63), una línea celular epitelial de las vías respiratorias (A549) y cultivos primarios de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). La Figura 7B muestra la destrucción intracelular de MRSA (cepa USA300) con 50 µg/ml de AAC **102** S4497-pipBOR en macrófagos, osteoblastos (MG63), células epiteliales de las vías respiratorias (A549) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) donde el anticuerpo S4497 no conjugado, no marcado no lo hace. Estos tipos de células probablemente expresen niveles totales más bajos de catepsina B que las células fagocíticas profesionales tales como los macrófagos, sin embargo, MRSA tratado con 50 µg/ml se destruyó eficazmente después de la internalización la totalidad de estas tres líneas celulares. La línea discontinua indica el límite de detección para el ensayo.

El análisis *in vitro* se realizó para comparar la actividad de AAC preparado con variaciones en el enlazador que une el anticuerpo al antibiótico. El AAC S4497-dimetil-pipBOR es más potente que el AAC S4497-pipBOR en el ensayo de destrucción intracelular en macrófagos. El AAC S4497-pipBOR y el AAC S4497-dimetil-pipBOR se valoraron para determinar la dosis mínima eficaz en el ensayo de destrucción intracelular en macrófagos de los presente inventores (Figura 7C). Puede ser necesario el tratamiento con al menos 2 µg/ml de AAC para lograr el aclaramiento óptimo de las bacterias intracelulares.

La Figura 7C muestra la comparación de AAC preparado con pipBOR **51** frente a dimetil-pipBOR (diMe-pipBOR) **54**. MRSA se opsonizó con el anticuerpo S4497 solo o con AAC: **102** S4497-pipBOR o **105** S4497-dimetil-pipBOR a varias concentraciones que varían de 10 µg/ml a 0,003 µg/ml. Estos datos revelaron que para ambos AAC, la destrucción óptima se produjo cuando se probaron AAC a más de 2 µg/ml, con una pérdida de actividad dependiente de la dosis que se hizo evidente a 0,4 µg/ml. El nivel general de destrucción fue significativamente superior con el AAC **105** S4497 dimetil-pipBOR. El tratamiento con dosis más altas de AAC **105** S4497-dimetil-pipBOR eliminó las bacterias intracelulares por debajo del límite de detección y se observó una destrucción de más de 300 veces usando una dosis subóptima de 0,4 µg/ml de AAC.

La Figura 7D muestra que AAC destruye las bacterias intracelulares sin dañar los macrófagos. La cepa USA300 de *S. aureus* se incubó previamente con 50 µg/ml del anticuerpo S4497 anti-*S. aureus* (anticuerpo) o con 50 µg/ml de AAC **105** S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR, durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo a la bacteria. Se añadieron bacterias opsonizadas a los macrófagos peritoneales murinos a múltiples infecciones de 10-20 bacterias por macrófago y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de completar la fagocitosis, se eliminaron las bacterias libres y los macrófagos se cultivaron durante 2 días en medios de crecimiento normales complementados con 50 µg/ml de gentamicina para destruir las bacterias no internalizadas. Al final del periodo de cultivo, la supervivencia de los macrófagos se evaluó detectando la liberación de lactato deshidrogenasa citoplasmática (LDH) en el sobrenadante del cultivo. La cantidad total de LDH liberada de cada pocillo se comparó con los pocillos de control que contienen macrófagos que se lisaron mediante la adición de detergente a los pocillos. Se midió la extensión de la lisis celular de macrófagos en los pocillos tratados con

detergente, macrófagos no infectados, macrófagos infectados con USA300 opsonizados previamente con anticuerpo S4497 o macrófagos infectados con USA300 opsonizados previamente con AAC **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR.

- 5 La Figura 7E muestra la recuperación de USA300 vivas del interior de macrófagos a partir de la lisis de células de macrófagos anterior. Los macrófagos se lisaron y las diluciones en serie del lisado celular se sembraron en placas para enumerar el número de bacterias intracelulares supervivientes.

- La Figura 9 muestra un ensayo de inhibición del crecimiento que demuestra que los AAC no son tóxicos para *S. aureus* a menos que el enlazador se escinda por la catepsina B. A la izquierda se muestra un ensayo esquemático de liberación de catepsina (Ejemplo 20). El AAC se trata con catepsina B para liberar antibiótico libre. La cantidad total de actividad antibiótica en el AAC intacto frente al tratado con catepsina B se determina preparando diluciones en serie de la reacción resultante y determinando la dosis mínima de AAC que puede inhibir el crecimiento de *S. aureus*. El gráfico superior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para **102** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR y el gráfico inferior derecho muestra el ensayo de liberación de catepsina para **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR.

EFICACIA DE CONJUGADOS ANTICUERPO CONJUGADO *IN VIVO*:

- 20 Se estableció un modelo de peritonitis *in vivo* en ratones para probar la eficacia de AAC. En este modelo, los ratones se infectan por inyección intraperitoneal (IP) de MRSA y la carga bacteriana se monitoriza 2 días después de la infección en el líquido peritoneal y el riñón. Las bacterias recogidas del peritoneo podrían encontrarse bien como bacterias libres extracelulares flotantes o internalizadas dentro de las células peritoneales, principalmente neutrófilos y macrófagos, que se reclutan en el sitio de la infección. Aunque las bacterias extracelulares identificadas en este modelo parecían ser sensibles al tratamiento con antibióticos, se demostró que las bacterias intracelulares no respondían al tratamiento con una serie de antibióticos clínicamente relevantes, incluyendo rifampicina (Sandberg et al (2009) Antimicrobial Agents Chemother) y, por lo tanto, parecían ser una excelente diana para evaluar la eficacia de los AAC de los presentes inventores.

- 30 La figura 8A muestra la eficacia *in vivo* del AAC **102** S4497-pipBOR. Modelo de infección intraperitoneal en ratones A/J. Los ratones se infectaron con 5×10^7 UFC de MRSA por inyección intraperitoneal y se trataron con 50 mg/Kg de anticuerpo S4497 solo o con 50 mg/Kg de AAC **102** S4497-pipBOR por inyección intraperitoneal (protocolo 11-2032A). Los ratones se sacrificaron 2 días después de la infección y se evaluó la carga bacteriana total en el sobrenadante peritoneal (bacterias extracelulares), en las células peritoneales (bacterias intracelulares) o en el riñón.

- 35 Los ratones A/J se infectaron con USA300 y se les administró 50 mg/Kg bien de anticuerpo S4497 o de AAC **102** S4497-pipBOR treinta minutos después de la infección. Después de 2 días, los ratones se sacrificaron y se monitorizaron las cargas bacterianas en el lavado peritoneal y el riñón. Para distinguir entre bacterias extracelulares e intracelulares, el lavado peritoneal se centrifugó suavemente para separar el sobrenadante, que contenía bacterias extracelulares, y las células peritoneales. Las células peritoneales se trataron con lisostafina para destruir cualquier bacteria extracelular contaminante y se lisaron para enumerar el número total de bacterias intracelulares en el momento de la recogida. Aunque los ratones tratados con anticuerpo solo albergaban entre 10^5 y 10^6 UFC de bacterias tanto intracelulares como extracelulares en el lavado peritoneal y entre 10^4 y 10^6 bacterias en el riñón, los ratones tratados con el AAC S4497-pipBOR AAC aclararon la infección por debajo del límite de detección. Estos datos revelaron que aunque el AAC está diseñado para liberar antibióticos activos dentro del fagolisosoma, se observó un aclaramiento excelente tanto de los grupos intracelulares como extracelulares de MRSA. Debido a que las bacterias extracelulares no se destruyen directamente por el AAC, el hecho de que estas bacterias también fueran eliminadas por el tratamiento con AAC sugiere que una fracción significativa de las bacterias extracelulares es captada por las células en algún momento durante la infección, o que el AAC puede potenciar la captación de bacterias extracelulares aumentando así la proporción relativa de bacterias que son intracelulares donde son eliminadas de manera eficaz por el AAC.

- También se examinó la eficacia del AAC en un modelo de infección intravenosa. En este modelo, los neutrófilos circulantes captan *S. aureus* poco después de la infección, de modo que la mayoría de las bacterias que se encuentran en la sangre están asociadas con las células hospedadoras en cuestión de minutos después de la infección (Rogers, et al. (1956) J. Exp. Med. 103:713-742). Los ratones A/J se infectaron con 2×10^6 UFC de MRSA por inyección intravenosa, y después se trataron con 50 mg/Kg de AAC por inyección intravenosa 30 minutos después de la infección. En este modelo, el sitio primario de infección es el riñón, y los ratones desarrollan grandes abscesos que son detectables dos días después de la infección y no pueden aclararse hasta 30 días en ausencia de tratamiento. El tratamiento con 50 mg/Kg del AAC **102** S4497-pipBOR aclaró la infección en todos los ratones probados (Figura 8B).

- La Figura 8B muestra el modelo de infección intravenosa en ratones A/J. Los ratones se infectaron con 2×10^6 UFC por inyección intravenosa y se trataron con 50 mg/Kg de anticuerpo S4497, 50 mg/Kg de AAC **102** S4497-pipBOR o con una mezcla simple de 50 mg/Kg de anticuerpo S4497 + 0,5 mg/Kg de rifamicina libre. Los tratamientos se suministraron mediante inyección IV 30 minutos después de la infección y los riñones se recogieron 4 días después

de la infección. La línea discontinua gris indica el límite de detección para cada órgano. Los grupos de control tratados con 50 mg/kg de anticuerpo S4497 solo, o con una mezcla simple de 50 mg/kg de anticuerpo S4497 más 0,5 mg/kg de rifamicina libre (la dosis equivalente de antibiótico presente en 50 mg/kg de AAC) no fueron eficaces.

- 5 Se comparó la eficacia de AAC preparado con restos antibióticos pipBOR y dimetil-pipBOR *in vivo* en el modelo de infección intravenosa en ratones A/J. El AAC **102** S4497-pipBOR (Figura 9A) o el AAC **105** S4497-dimetil-pipBOR (Figura 9B) se administraron a varias dosis que varían desde 50 mg/kg a 2 mg/kg 30 minutos después de la infección y se examinaron los riñones 4 días después de la infección para determinar la carga bacteriana total. La Figura 9A muestra la eficacia de AAC **102** pipBOR en un modelo de infección intravenosa por titulación del AAC **102** S4497-pipBOR. Se infectaron ratones A/J hembra de siete semanas de edad con 2×10^6 UFC de MRSA (cepa USA300) por inyección intravenosa en la vena de la cola. La Figura 9B muestra la eficacia de AAC **105** dimetil-pipBOR en el modelo de infección intravenosa por titulación del AAC **105** S4497-dimetil-pipBOR. Se administraron tratamientos con anticuerpo S4497, AAC **102** o AAC **105** a las dosis indicadas 30 minutos después de la infección. Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes por ratón (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas.

Ambos AAC fueron eficaces a la dosis más alta de 50 mg/Kg, sin embargo, el AAC **102** S4497-pipBOR solo fue parcialmente eficaz a dosis más bajas. El AAC **105** S4497-dimetil-pipBOR produjo un aclaramiento bacteriano completo a dosis superiores a 10 mg/kg. Experimentos posteriores indicaron que se requerían dosis superiores a 15 mg/kg para un aclaramiento bacteriano consistente. Las Figuras 9A y 9B muestran que AAC **105** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es más eficaz que AAC **102** tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR en un modelo de infección intravenosa lo que indica un efecto de la distinción estructural del carbamato (**51**) y el dimetilpiperidilo (**54**) entre **102** y **105**, respectivamente.

- 25 Los ratones se trataron con el AAC 30 minutos después de la infección. Para replicar mejor las condiciones que probablemente se producen en pacientes con MRSA que buscan tratamiento, se determinó si el AAC es eficaz para aclarar una infección establecida y que la vinculación del antibiótico con un anticuerpo anti-*S. aureus* proporciona una ventaja definitiva sobre el tratamiento con antibiótico solo. Con este fin, se comparó la eficacia de AAC con una dosis equivalente del antibiótico dimetil-pipBOR.

30 La Figura 9C muestra ratones CB17.SCID infectados con 2×10^7 UFC de MRSA por inyección intravenosa (protocolo 12-2418). Un día después de la infección, los ratones se trataron con 50 mg/Kg de anticuerpo S4497, 50 mg/Kg de AAC **105** S4497 dimetil-pipBOR o con 0,5 mg/Kg de antibiótico 7 dimetil-pipBOR, la dosis equivalente de antibiótico contenida en 50 mg/Kg de AAC). Los ratones se sacrificaron 4 días después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes por ratón (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas. El tratamiento con 50 mg/Kg de AAC S4497-dimetil-pipBOR fue claramente eficaz cuando se administró 1 día después de la infección, mientras que el tratamiento con la dosis equivalente de dimetil-pipBOR solo no logró aclarar la infección.

40 EL TRATAMIENTO CON UN AAC ES EFICAZ EN PRESENCIA DE ANTICUERPOS HUMANOS Y SUPERIOR AL TRATAMIENTO CON EL TRATAMIENTO DE REFERENCIA (SOC) ACTUAL CON VANCOMICINA

El anticuerpo S4497 se clonó a partir de linfocitos B derivados de pacientes infectados por *S. aureus*. Esto planteó la preocupación de que el suero humano normal, o el suero presente en pacientes infectados con MRSA, puede contener anticuerpos anti-MRSA que competirían por unirse con el AAC de los presentes inventores. Para abordar esto, se probó el suero humano derivado de donantes sanos normales y un panel de pacientes con MRSA para estimar el nivel general de anticuerpos anti-MRSA que reconocen el mismo antígeno que el AAC. Se desarrolló un ensayo basado en ELISA usando preparaciones de pared celular de MRSA. Para limitar la unión no específica de antígeno a las preparaciones de la pared celular en estos ensayos, se utilizó una cepa de MRSA que es deficiente en el gen para la proteína A. La proteína A se une a la región Fc de los anticuerpos IgG. Se examinó la unión de varias muestras de suero de tipo silvestre (WT) a MRSA que expresaban el antígeno de S4497 (Figura 10A, WT) frente a la unión a un mutante de la cepa de MRSA TarM/TarS DKO (doble nuligénica) que carece de las modificaciones de azúcares que reconoce el anticuerpo S4497. La Figura 10A muestra la prevalencia de anticuerpos anti-*S. aureus* en suero humano. Los pacientes infectados por *S. aureus* o los controles normales contienen altas cantidades de anticuerpo sérico específico de WTA con la misma especificidad que S4497 anti-WTA.

55 Se generó una curva patrón utilizando un anticuerpo monoclonal que se une bien al mismo antígeno reconocido por S4497. Al comparar el nivel de unión en muestras de suero con la señal obtenida del anticuerpo utilizado para generar la curva patrón, se estimó el nivel de anticuerpos anti-MRSA presentes en muestras de suero derivadas de donantes sanos normales o pacientes con MRSA, o en preparaciones de IgG total aisladas de suero normal (Figura 10A). El suero humano normal contiene 10-15 mg/ml de IgG total (Manz et al. (2005) Annu Rev. Immunol. 23:367). El análisis de la reactividad anti-MRSA en las diferentes muestras de suero reveló que hasta 300 µg/ml de estos anticuerpos son potencialmente reactivos con el mismo antígeno reconocido por S4497 y, por lo tanto, es probable que compitan por la unión con el AAC.

- 65 El anticuerpo S4497 se usó para generar AAC para determinar las propiedades incluyendo la unión muy alta en MRSA (50.000 sitios de unión estimados por bacteria). Un número suficiente de AAC puede ser capaz de unirse a

MRSA incluso en presencia de los anticuerpos competidores encontrados en el suero humano. Para probar esto directamente, se tituló el AAC S4497-dimetil-pipBOR en tampón complementado con 10 mg/ml de IgG humana (Figura 10B, +IGIV) y se midió el nivel de destrucción intracelular en el ensayo de destrucción intracelular de macrófagos.

La figura 10B muestra un modelo de infección *in vivo* que demuestra que AAC es eficaz en presencia de niveles fisiológicos de IgG humana. El ensayo de macrófagos *in vitro* con la cepa USA300 de MRSA muestra que AAC 105 S4497-dimetil-pipBOR es eficaz en presencia de 10 mg/ml de IgG humana. La cepa USA300 de MRSA se opsonizó con AAC solo, o con AAC diluido en 10 mg/ml de IgG humana durante 1 hora a 37 °C con agitación. Las bacterias opsonizadas se añadieron directamente a los macrófagos peritoneales murinos y se incubaron durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de la infección, los cultivos de macrófagos se mantuvieron en medios completos complementados con gentamicina y se evaluó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después de la infección. Estos datos revelaron que aunque la IgG humana inhibió la destrucción por AAC a las dosis más bajas, se logró una excelente destrucción utilizando dosis superiores a 10 µg/ml, una concentración de anticuerpos que se puede lograr fácilmente *in vivo*. La IgG sérica normal puede disminuir el efecto funcional de AAC 105. Debido a que la máxima actividad de destrucción intracelular de macrófagos de un AAC puede requerir una alta unión al antígeno y una interacción eficaz con los FcR (para la opsonofagocitosis), los anticuerpos séricos preexistentes pueden competir ambos por unirse a WTA y los complejos inmunitarios formados correspondientes compiten por unirse a los FcR en macrófagos.

Para confirmar que el AAC sería eficaz en presencia de anticuerpos humanos de competencia *in vivo*, el modelo de infección *in vivo* se modificó para generar ratones que expresen niveles normales de IgG humana en el suero. Se reconstituyeron ratones CB17:SCID, que carecen tanto de linfocitos T como de linfocitos B y, por lo tanto, no tienen anticuerpos en el suero (Bosna & Carroll, (1991) Ann Rev Immunol. 9:323), con 10 mg/ml de IgG humana por dosificación diaria de IgG humana altamente concentrada (IGIV). Los estudios preliminares confirmaron que estos ratones, denominados SCID:hulgG, tenían, de hecho, niveles sostenidos de al menos 10 mg/ml de IgG humana en el suero y que estos ratones eran igualmente susceptibles a la infección por MRSA en comparación con los controles no tratados. Los ratones SCID:hulgG se infectaron con MRSA y se trataron bien con el anticuerpo S4497 o con el AAC S4497-dimetil-pipBOR (50 mg/Kg) 1 día después de la infección. Cuatro días después de la infección se evaluó la carga bacteriana en los riñones (Fig. 10C).

La Figura 10C muestra los datos combinados de 3 experimentos independientes usando 2 preparaciones separadas de AAC 105 o 112 tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetil-pipBOR. Los ratones CB17:SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/Kg) o AAC S4497-dimetil-pipBOR (50 mg/Kg). Los ratones tratados con el AAC tuvieron una reducción mayor de 4 en escala logarítmica en las cargas bacterianas (prueba t de Student $p = 0,0005$). Las cargas bacterianas fueron en promedio más de 10.000 veces más bajas en los ratones tratados con el AAC S4497-dimetil-pipBOR en comparación con los ratones tratados con el control de anticuerpos S4497, indicando que el AAC fue claramente eficaz incluso en presencia de altos niveles de anticuerpos humanos anti-MRSA de competencia.

La eficacia del AAC se comparó con la del tratamiento con vancomicina, el tratamiento de referencia actual para las infecciones por MRSA. La figura 11A muestra el modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC es más eficaz que el antibiótico vancomicina de tratamiento de referencia (SOC) actual en ratones que se reconstituyen con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17:SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/Kg), vancomicina (100 mg/Kg), AAC S4497-dimetil-pipBOR (50 mg/Kg), 112 o un AAC preparado con un anticuerpo de control de isotipo que no reconoce MRSA, AAC 110 tio-hu-anti gD 5B5-HC-A118C-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR (50 mg/Kg). Se administró, a los ratones que recibieron AAC, una dosis única de AAC el día 1 después de la infección mediante inyección intravenosa. Se administró, a los ratones que recibieron tratamientos con vancomicina, dos veces al día inyecciones del antibiótico por inyección intraperitoneal. Todos los ratones se sacrificaron el día 4 después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes por ratón (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas.

El tratamiento con vancomicina es eficaz para tratar la infección por MRSA en el modelo de infección intravenosa murina de los presentes inventores si el tratamiento se inicia 30 minutos después de la infección. La dosis dos veces al día con 100 mg/kg de vancomicina no logró aclarar la infección y solo fue capaz de reducir las cargas bacterianas en aproximadamente 50 veces, cuando se inició el tratamiento más de 1 día después de la infección (Figura 11A). Asombrosamente, el tratamiento con una dosis única del AAC S4497-dimetil-pipBOR 1 día después de la infección fue capaz de aclarar la infección en la mayoría de los ratones. Sorprendentemente, el tratamiento con AAC de control preparado con un anticuerpo IgG humano que no reconoce *S. aureus* (gD-AAC) tuvo cierta eficacia en este modelo. El anticuerpo gD no reconoce *S. aureus* a través de su sitio de unión a antígeno, sin embargo, el anticuerpo es capaz de unirse a la proteína A que se encuentra en *S. aureus*.

La figura 11C muestra el modelo de infección *in vivo* que demuestra que el AAC, 129 tio-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR es más eficaz que el anticuerpo anti-WTA S4497 no marcado, de acuerdo con el mismo

régimen que la Figura 11A, en ratones que se reconstituyen con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones se trataron con anticuerpo S4497 (50 mg/Kg) o con AAC 129 tio-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-dimetilpipBOR (50 mg/Kg).

El análisis FACS mostró que la tinción con altas concentraciones del anticuerpo gD en bacterias aisladas de una infección *in vivo* produce un bajo nivel de unión a *S. aureus* respecto a la unión de anticuerpos anti-MRSA a MRSA aislado de riñones infectados (Figura 11B). Los ratones se infectaron con MRSA mediante inyección intravenosa y los riñones infectados se eliminaron 3 días después de la infección y se homogeneizaron. Los anticuerpos anti-MRSA o de control se marcaron con Alexa-488 y se analizaron en un intervalo de concentraciones entre 0,08 µg/ml y 50 µg/ml. El anticuerpo S4497 reconoce una modificación de N-acetilglucosamina que está enlazada al ácido teicoico de la pared (WTA) a través de un enlace beta-anomérico en la pared celular de *S. aureus*. El anticuerpo S7578 se une a una modificación similar de N-acetilglucosamina que se une a WTA a través de un enlace alfa-anomérico. El anticuerpo rF1 es un anticuerpo anti-MRSA de control positivo que reconoce las modificaciones de azúcares encontradas en una familia de proteínas ancladas a la pared celular que contienen repetición de SDR. El anticuerpo gD es una IgG₁ humana de control negativo que no reconoce *S. aureus*. Aunque el nivel general de unión con el anticuerpo gD es significativamente menor que el obtenido con el anticuerpo S4497 (estimado que es al menos 30 veces menor por análisis FACS, Figura 11B), la eficacia limitada observada con el gD-AAC indica que incluso la unión a bajo nivel de un AAC en MRSA *in vivo* es suficiente para producir una eficacia que parecía equivalente a la reducción en las UFC obtenidas con vancomicina.

Los datos anteriores demuestran claramente que los AAC son capaces de destruir el MRSA intracelular y que los AAC S4497-pipBOR y S4497 dimetil-pipBOR son eficaces para limitar la infección por MRSA tanto *in vitro* como *in vivo*. Los AAC de la invención actúan destruyendo las bacterias dentro de las células de mamíferos y, de este modo, proporcionan un tratamiento terapéutico único que es más eficaz para destruir las poblaciones de bacterias que son resistentes al tratamiento con vancomicina.

La Figura 20 muestra que el tratamiento previo con 50 mg/kg de anticuerpos libres no es eficaz en un modelo de infección intravenosa. Los ratones Balb/c recibieron una dosis única de vehículo control (PBS) o 50 mg/kg de anticuerpos por inyección intravenosa 30 minutos antes de la infección con 2×10^7 UFC de USA300. Los grupos de tratamiento incluyeron un anticuerpo de control de isotipo que no se une a *S. aureus* (gD), un anticuerpo dirigido contra la modificación beta del ácido teicoico de la pared (4497) o un anticuerpo dirigido contra la modificación alfa del ácido teicoico de la pared (7578). Los ratones control recibieron tratamientos dos veces al día con 110 mg/kg de vancomicina mediante inyección intraperitoneal (Vanco). Todos los ratones se sacrificaron el día 4 después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes los riñones (2 riñones agrupados) mediante siembra en placas. Aunque el tratamiento previo con vancomicina aclaró la infección en todos los ratones probados, el tratamiento previo con anticuerpos dirigidos contra la pared celular de *S. aureus* no tuvo efecto sobre las cargas bacterianas.

Las Figuras 21 y 22 muestran que los AAC dirigidos contra la modificación beta del ácido teicoico de la pared o contra la modificación alfa del ácido teicoico de la pared son eficaces en un modelo de infección intravenosa que usa ratones reconstituidos con niveles normales de IgG humana. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero e se infectaron con 2×10^7 UFC de USA300 por inyección intravenosa. El tratamiento se inició 1 día después de la infección con control de solo tampón (PBS), 60 mg/Kg de AAC de WTA-beta (AAC 136) o 60 mg/Kg de AAC de WTA-alfa (AAC 155). Los ratones se sacrificaron el día 4 después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes en los riñones (2 riñones agrupados, Figura 21) y el corazón (Figura 22) mediante siembra en placas. El tratamiento con el AAC de WTA-beta dio como resultado una reducción de 100.000 veces en la carga bacteriana en el riñón en comparación con los ratones tratados con el vehículo control. El tratamiento con el AAC de WTA-alfa dio como resultado una reducción promedio de 9.000 veces en la carga bacteriana en el riñón.

Hasta la fecha, sigue siendo incierto por qué los antibióticos disponibles actualmente son a con frecuencia ineficaces para destruir las reservas intracelulares de bacterias. Los antibióticos pueden fallar porque no alcancen concentraciones suficientes dentro de las células, ya sea porque no entran al compartimento fagolisosómico donde residen las reservas intracelulares de bacterias o porque pueden estar sujetos a la actividad de las bombas de eflujo que eliminan el antibiótico de las células de los mamíferos. Los antibióticos pueden dañarse por condiciones severas que se encuentran dentro del fagolisosoma, incluido un pH bajo, agentes reductores y agentes oxidantes que se liberan específicamente para destruir la bacteria fagocitada. Alternativamente, los antibióticos pueden fallar porque las bacterias regulan los mecanismos de defensa o no se dividen dentro del fagolisosoma y, por lo tanto, se vuelven transitoriamente insensibles a los antibióticos. La importancia relativa de estos mecanismos de resistencia a los antibióticos será diferente para los diferentes patógenos y para cada antibiótico. El componente antibiótico de los AAC de los presentes inventores, pipBOR y dimetil-pipBOR son de hecho más potentes que la rifampicina para destruir el MRSA intracelular cuando se prueban como antibióticos libres. La unión de estos antibióticos a un anticuerpo proporciona un aumento real dependiente de la dosis de la eficacia que es evidente *in vivo* (Figura 9C). En este caso, es probable que la eficacia mejorada del AAC sobre el antibiótico solo se deba a una combinación de

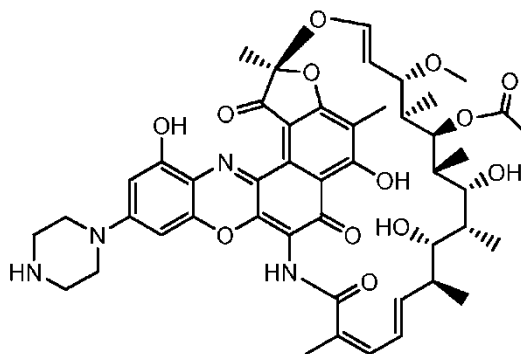
su capacidad para opsonizar bacterias y a una farmacocinética mejorada de AAC. La mayoría de los antibióticos libres se aclaran rápidamente *in vivo* y requieren dosis repetidas con altas concentraciones de antibiótico para mantener concentraciones suficientes de antibiótico en suero. Por el contrario, los AAC tienen semividas largas en suero debido a la porción de anticuerpo de la molécula. Debido a que los AAC liberan el antibiótico solo después de unirse a *S. aureus* y ser transportados junto con la bacteria al espacio confinado del fagolisosoma, concentran pequeñas dosis de antibiótico específicamente en un nicho donde fracasan la mayoría de los antibióticos. Por lo tanto, además de actuar de forma selectiva en reservorios protegidos de bacterias intracelulares, los AAC pueden facilitar el uso de antibióticos más potentes que pueden resultar demasiado tóxicos para su uso como agente único al limitar la liberación del antibiótico donde más se necesita.

Las Figuras 35 y 36 muestran los resultados del Ensayo de macrófagos *in vitro* para AAC tio-S6078. Se incubó *S. aureus* (USA300 NRS384) con anticuerpo S6078 no conjugado a 50 ug/ml y AAC a 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml o 0,05 µg/ml durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo a la bacteria. Las bacterias opsonizadas resultantes se proporcionaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37 °C para permitir la fagocitosis. Después de 2 horas, la mezcla de infección se eliminó y se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante. El número total de bacterias intracelulares supervivientes se determinó 2 días después mediante la siembra en placa de diluciones en serie de los lisados de macrófagos en placas de Agar de Soja Triptico. En la figura 35, el AAC tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) fue eficaz para destruir bacterias intracelulares a dosis iguales o superiores a 0,5 µg/ml con una carga antibiótica de 2,0 (AAC-173) o 3,9 (AAC-171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA-54) por anticuerpo tio-S6078. En la figura 36, tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(piperazBOR) fue eficaz para destruir bacterias intracelulares a dosis iguales o superiores a 0,5 µg/ml con una carga antibiótica de antibióticos piperazBOR (LA-65) de 1,8 (AAC-174) o 3,9 (AAC-172) por anticuerpo tio-S6078.

Las Figuras 37 y 38 muestran resultados de la eficacia *in vivo* de AAC tio-S6078 en un modelo murino de infección intravenosa. Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron infectados con USA300 y tratados con vehículo control (PBS), AAC tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) con una carga antibiótica de 2,0 (AAC-173) o 3,9 (AAC-171) de antibióticos dimetilpipBOR (LA-54) por anticuerpo tio-S6078 (Figura 37) y tio-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(piperazBOR) con una carga antibiótica de 1,8 (AAC-174) o 3,9 (AAC-172) de antibióticos piperazBOR (LA-65) por anticuerpo tio-S6078 (Figura 38). Los ratones recibieron una dosis única de AAC el día 1 después de la infección mediante inyección intravenosa y se sacrificaron el día 4 después de la infección. El número total de bacterias supervivientes en 2 riñones se determinó mediante siembra en placas. El tratamiento con AAC que contenían una carga antibiótica más baja redujo las cargas bacterianas en aproximadamente 1.000 veces y el tratamiento con AAC que contenían una carga antibiótica más alta redujo las cargas bacterianas en más de 10.000 veces.

ENLACES ESCINDIBLES POR ESTAFOPAINA B PARA CONJUGADOS ANTICUERPO-ANTIBIÓTICO

En el presente documento se describe un enlazador escindible por proteasa para ser escindido por estafopaina B, una endopeptidasa secretada por *S. aureus*. Para diseñar un enlazador escindido de manera específica por la bacteria *Staphylococcus aureus*, se caracterizó el sobrenadante de cultivo de *S. aureus* con actividad proteasa usando una biblioteca de péptidos de FRET. A partir de esta exploración, se identificó una especificidad de sustrato única. Usando este sustrato, la enzima responsable de la actividad se purificó del sobrenadante de cultivo y se identificó como estafopaina B. Basándose en esta identificación, se generó un enlazador optimizado para estafopaina B y se enlazó a piperazino-rifamicina:



Piperazino-rifamicina es un antibiótico potente de tipo rifalazil. El AAC resultante ha demostrado eficacia en modelos de infección por MRSA *in vitro* e *in vivo*, proporcionando un mecanismo novedoso para actuar de forma selectiva contra infecciones por MRSA. La estafopaina B es una cisteína proteasa secretada de la familia de papaína de las endopeptidasas (N.º de Reg. CAS 347841-89-8, Sigma-Aldrich número S3951, Filipek et al (2005) J. Biol. Chem. 280 (15): 14669-74) y ha evolucionado para tener una especificidad de sustrato exclusiva, prefiriendo cadenas laterales

aromáticas voluminosas en la posición P2. La expresión de estafopaina B está controlada por el sistema de percepción de cuórum *agr* (o regulador de genes accesorio) (Janzon, L. y S. Arvidson (1990) The EMBO journal 9 (5): 1391-1399) como parte de la cascada proteolítica estafilocócica (SCP, por sus siglas en inglés). Agr modula la expresión de proteasas secretadas y otros factores de virulencia de *S. aureus* incluyendo aureolisina, V8 y estafopaina A (Shaw, L., E. Golonka, et al. (2004) Microbiology 150(Pt 1): 217-228). La estafopaina B se ha implicado como un potente factor de virulencia debido a su capacidad para degradar el tejido conectivo del hospedador, así como para aumentar varias proteínas del sistema inmunitario (Imamura, T., S. Tanase, et al. (2005) Journal of experimental medicine 201(10): 1669-1676; Potempa, J., A. Dubin, et al. (1988) Journal of biological chemistry 263(6): 2664-2667; Ohbayashi, T., A. Irie, et al. (2011) Microbiology 157(Pt 3): 786-792; Smagur, J., K. Guzik, et al. (2009); Biological chemistry 390(4): 361-371; Smagur, J., K. Guzik, et al. (2009); Journal of innate immunity 1(2): 98-108; Kulig, P., B. A. Zabel, et al. (2007); Journal of immunology 178(6): 3713-3720). El papel de la estafopaina B como un importante factor de virulencia la convierte en una diana atractiva para la liberación de antibióticos mediada por proteasas.

15 Identificación de sustratos escindidos por proteasas de *Staphylococcus aureus*:

Para identificar sustratos fácilmente escindidos por endopeptidasas de *S. aureus*, se incubó sobrenadante de un cultivo durante la noche de la cepa Wood46 de *S. aureus* con una biblioteca de péptidos de FRET disponible comercialmente. La cepa Wood46 tiene un locus *agr* constitutivamente activo, por lo tanto, la cepa Wood46 muestra una expresión de proteasa aumentada en comparación con el tipo silvestre. La biblioteca de péptidos de FRET, Biblioteca de Perfiles de Endopeptidasas Rápidas o PepSets™ REPLi (por sus siglas en inglés) (Mimotopes, Victoria, Australia), consiste en 512 pocillos con 8 péptidos fluorogénicos desactivados internamente por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. Los péptidos emiten fluorescencia tras la escisión, lo que permite monitorizar la actividad proteolítica en tiempo real. Cada péptido tiene un núcleo tripeptídico variable flanqueado por una serie de restos de glicina a cada lado y dos restos de lisina adicionales en el extremo C para determinar la solubilidad. El sobrenadante del cultivo Wood46 se añadió a la biblioteca y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Los pocillos que mostraban un aumento de fluorescencia superior a 15 veces (12 de 512 pocillos en total) se analizaron por LC-MS (Agilent Q-TOF) para determinar los productos de escisión. Los sitios de escisión se clasificaron basándose en la frecuencia (Tabla 4). Entre los mejores resultados, se observó un patrón en la especificidad del sustrato, específicamente una preferencia por cadenas laterales hidrófobas voluminosas de Phe y Tyr en la posición P2.

Tabla 4. Preferencias de aminoácidos de las secuencias REPLi escindidas por proteasas secretadas por Wood46. Abundancia en cada posición (%)

Restos	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
G	71,4	50,0	0,0	28,6	35,7	100,0
I/L	21,4	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0
A/V	0,0	14,3	0,0	50,0	28,6	0,0
N/Q	7,1	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0
S/T	0,0	14,3	0,0	14,3	0,0	0,0
F/Y	0,0	0,0	100,0	0,0	21,4	0,0
K/R	0,0	7,1	0,0	7,1	0,0	0,0

Abundancia en cada posición de restos de aminoácidos presentes en los péptidos de FRET de los pocillos que mostraron el mayor aumento en la fluorescencia. Los péptidos REPLi contienen la secuencia MCA-Gly-Gly-Gly-Xaa-Yaa-Zaa-Gly-Gly-DPA-Lys-Lys (SEQ ID NO: 132), donde Xaa, Yaa y Zaa varían. Los restos de glicina presentes en la tabla representan los restos de Gly que flanquean el núcleo variable. Mientras que los restos de Gly son los más abundantes en varias posiciones, dan poca información sobre la especificidad del sustrato. Al diseñar los enlazadores, se dio preferencia a los aminoácidos del núcleo variable. Los aminoácidos que no estaban en ninguno de los mejores resultados se omitieron de la tabla.

Diseño y conjugación de un sustrato de FRET escindido por una proteasa de MRSA *in vitro*:

Se diseñó y sintetizó un péptido usando los restos más frecuentes en los péptidos escindidos de la exploración REPLi usando información de especificidad para P1, P2 y P3. El péptido tenía la secuencia GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126) con la escisión esperada entre GGAF (SEQ ID NO: 131) y GGG. El péptido se sintetizó usando síntesis en fase sólida que incorpora colorantes fluorescentes, tetrametilrodamina (TAMRA) y fluoresceína como un par de FRET (Figura 26) con ácido maleimido-propiónico añadido al extremo N para permitir la conjugación con los restos de cisteína del anticuerpo. El mal-FRET-péptido resultante, maleimido-propiónico (MP)-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125), se conjugó con el anticuerpo tioMab modificado por ingeniería con cisteína, tio-S4497. El mal-FRET-péptido también se conjugó con el tioMab trastuzumab modificado por ingeniería con cisteína anti-Her2, un control que no se une.

El conjugado de FRET tio-S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) y el conjugado de FRET de control que no se une, tio-trastuzumab-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(flouresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125), se incubaron con cultivos en fase logarítmica de Wood46 (Figura 28) y de tipo silvestre, USA300 (Figura 29), a densidades celulares de 10^8 células/ml y 10^7 células/ml en caldo de soja triptico (TSB, por sus siglas en inglés). La concentración final de MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Lys (fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) para todos los pocillos fue 2 μ M. La fluorescencia se monitorizó a lo largo del tiempo a 37 °C, excitación 495nm/emisión 518nm. Se observó un aumento en la fluorescencia con el conjugado 4497-mal-FRET-péptido tanto en Wood46 como en USA300, indicando que el péptido de FRET se escinde por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en ambas cepas. La unidad enlazadora MP-K(TAMRA)GGAFAGGGK(flouresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) se escinde tanto en Wood46 como en USA300 cuando se conjugaba con un anticuerpo que se une a *S. aureus*. La validación de la escisión de este enlazador modelo en USA300 fue crítica debido a su relevancia para la cepa clínica de MRSA a la que se dirigiría un posible conjugado terapéutico anticuerpo-antibiótico (AAC). El conjugado de FRET tio-S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK (fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) muestra un aumento de fluorescencia en ambas cepas, indicando que el enlazador se escinde por una proteasa de *S. aureus* y que la proteasa está presente en la cepa clínicamente relevante de MRSA, USA300. La densidad celular afecta la tasa de escisión, produciéndose escisión antes en los cultivos de mayor densidad celular. El conjugado de control que no se une tio-trastuzumab-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Flouresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) no mostró un aumento de fluorescencia en ninguna condición probada.

Basándose en el sustrato escindido de los ensayos basados en células, el producto intermedio enlazador-antibiótico LA-59 (Tabla 2) se preparó y se conjugó con anticuerpos para formar una cadena pesada anti-MRSA, tio-S4497 (AAC-113) y tio-S4462 (AAC-114) modificados por ingeniería con cisteína y tio-trastuzumab de cadena ligera anti-HER2 (AAC-115) de la Tabla 3. El AAC enlazado a GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126) demostró mejores tasas de escisión que el FRET-péptido cuando se incubó con sobrenadante concentrado de un cultivo Wood46 durante la noche, indicando que el enlazador-antibiótico es un mejor sustrato para la proteasa de interés desconocida. La escisión se produjo en el sitio esperado entre alanina y glicina en los AAC enlazados a GGAFAGGG ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) (AAC-113, AAC-114, AAC-115). Este enlazador-antibiótico (LA-59) no es un sistema de suministro optimizado para el antibiótico porque después de la escisión, se libera GGG-rifamicina en lugar de rifamicina libre. Si bien el potencial terapéutico de este enlazador-antibiótico puede ser incierto, su capacidad para ser escindido de manera eficaz por la proteasa lo convierte en un compuesto instrumental útil para identificar fracciones que contienen la proteasa activa de interés. El producto intermedio enlazador-antibiótico LA-59 se conjugó con la porción Fab del anticuerpo tio-S4497 (Scheer, J. M., W. Sandoval, et al. (2012). PLoS one 7(12): e51817). Los anticuerpos Fab modificados por ingeniería con cisteína, "tioFAB", tienen una cisteína reactiva que permite la conjugación específica de sitio de un compuesto reactivo de tiol. Se hizo reaccionar tioFAB S-4497 con un exceso molar de 3 veces de LA-59 sobre tioFAB durante 1 hora en TRIS 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM a temperatura ambiente. El exceso de LA-59 se separó de AAC por diafiltración en PBS. El conjugado resultante, tioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) (Figura 27), se usó como un compuesto instrumental para identificar fracciones activas, con análisis LC-MS que detectó la escisión del enlazador.

Optimización de los enlazadores para una escisión eficaz por estafopaina B:

El producto intermedio enlazador-antibiótico LA-59, MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126), tiene restos de sustrato optimizados para las posiciones P1, P2 y P3. Usando los resultados de la exploración REPLi, se diseñaron y sintetizaron dos nuevos enlazadores incorporando una preferencia de resto por P4 (Figura 30). Se sintetizaron maleimido-propiónico-Leu-Ala-Phe-Ala-Ala ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) y maleimido-propiónico-Leu-Ala-Phe-Gly-Ala ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) usando síntesis en fase sólida. Isoleucina y leucina fueron los restos más frecuentes en P4 en la exploración REPLi (sin tener en cuenta la glicina). Solo se eligió un resto, Leucina, para limitar el número de enlazadores sintetizados. Ala y Gly se alternaron en la posición P1 para examinar el efecto sobre la escisión. También se incluyó un resto en P1', Ala. Se añadió cloruro de QSY®7 (xantilio, 9-[2-[[4-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]carbonil]-1-piperidinil]sulfonil]fenil]-3,6-bis(metilfenilamino) -NHS éster, N.º de Reg. CAS 304014-12-8, Life Technologies) al extremo C de ambos enlazadores para actuar como un sustituto de antibiótico (Figura 30). La incorporación de QSY®7 permitió evaluar la capacidad de escisión de estos enlazadores sin consumir antibióticos costosos y laboriosos.

Los enlazadores experimentales mal-péptido-QSY7 se conjugaron con THIOFAB S4497 para evaluar la capacidad de escisión de estos enlazadores. Las conjugaciones se realizaron como se describe anteriormente. Los conjugados resultantes THIOFAB S4497 enlazador-QSY7 se evaluaron para determinar la capacidad de escisión por estafopaina B, estafopaina A y cathepsina B humana a pH 7,2 (Tabla 5). Como la estafopaina B, la estafopaina A es una cisteína proteasa secretada de *S. aureus* de la familia de las proteasas de papaína. Es estructuralmente similar a la estafopaina B, pero tiene una especificidad de sustrato más amplia (Filipek, R., M. Rzychon, et al. (2003). The Journal of biological chemistry 278(42): 40959-40966). La Cathepsina B, una cisteína proteasa lisosómica de mamífero, también es miembro de la familia de las endopeptidasas de papaína. Se cree que escinde los enlazadores de valina-citrulina utilizados en otros enlazadores de AAC descritos en esta patente.

Tabla 5. Escisión de enlazadores optimizados por estafopainas y catepsina B humana

		Estafoína A	Estafoína B	Catepsina B
MP-LAFGA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) (Figura 30)	Porcentaje de escisión a pH 7,2	38	100	100
	Producto de escisión	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7
MP-LAFGA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) (Figura 30)	Porcentaje de escisión a pH 7,2	23	100	100
	Producto de escisión	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7, QSY7
MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) LA-104	Porcentaje de escisión a pH 5	100	100	100
	Porcentaje de escisión a pH 7,2	46	100	64
	Producto de escisión	piperazino-rifamicina	piperazino-rifamicina	

La Tabla 5 muestra los datos de la escisión de los enlazadores optimizados conjugados con tioFAB por la estafoína A, estafoína B y catepsina B. El enlazador-antibiótico final, MP-LAFG-piperazino-rifamicina ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) se escinde eficazmente por las tres proteasas. La escisión por las estafoínas da como resultado la liberación de rifamicina libre. La escisión por catepsina B libera Phe-Gly-piperazino-rifamicina (Ejemplo 26).

Diseño y conjugación de un enlazador escindible por estafoína B que libera antibiótico libre: De los ensayos de escisión de los enlazadores experimentales probados, se seleccionó mal-LAFGA ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) para la fijación a antibiótico. Se requirió una optimización adicional de este enlazador para lograr la liberación libre de antibióticos tras la escisión proteolítica. Para conseguir esto, se reemplazó la Ala en P1' por p-aminobencilo (PAB) o p-aminobenciloxycarbonilo (PABC). Se añadió piperazino-rifamicina al extremo C de este enlazador para completar los productos intermedios enlazador-antibiótico LA-88 MC-LAFG-PAB-(dimetilamino-3-pirrolBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) y LA-104, MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128). Tras la escisión después de la Gly en la posición P1, los grupos PAB y PABC están diseñados para autoinmolearse, liberando antibiótico libre. LA-88 se conjugó para formar AAC-163 tio-S4497-v8-LCV205C-MC-LAFG-PAB-(dimetilamino-3-pirrolBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) (Tabla 3). LA-104 se conjugó para formar AAC-193, AAC-215 y AAC-222. Se realizaron ensayos de escisión de AAC 193 con estafoína A, estafoína B y catepsina B a pH 7,2 y pH 5. Estos valores de pH se seleccionaron para imitar el plasma (pH 7,2) o el entorno del fagolisosoma (pH 5). La estafoína B logró una escisión del 100 % a pH 5 y 7,2. La estafoína A mostró una escisión del 100 % a pH 5 y una escisión del 64 % a pH 7,2.

La sustitución de PABC por Ala en el grupo P1' cambió la ubicación en la que la catepsina B escinde el enlazador. Tras la escisión por catepsina B, se liberó Phe-Gly-PABC-(piperazinoBOR). Como tratamiento terapéutico, la posible escisión de este enlazador por catepsina B probablemente se produciría en el compartimento lisosómico de los macrófagos. En estas circunstancias, otras proteasas, incluyendo estafoína B, pueden procesar adicionalmente FG-PABC-piperazino-rifamicina para liberar antibiótico libre.

El producto intermedio enlazador-antibiótico, LA-104 MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) se conjugó con tioMAB S4497 para evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de los AAC resultantes AAC-193, AAC-215, AAC-222. También se prepararon dos conjugados de control conjugando LA-104 con tioMAB anti-Her2 y tioMAB anti-gD, ambos controles de isotipo. El conjugado tioMAB 4497 MP-LAFG-PABC-piperazino-rifamicina ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) AAC-215, enlazado a la cadena ligera tenía una relación fármaco/anticuerpo (DAR) de 1,6, al igual que el conjugado de control tioMAB anti-gD. El conjugado tioMAB anti-Her2 mal-LAFG-PABC-piperazino-rifamicina ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) tenía una DAR de 1,5.

El sobrenadante de cultivo de *S. aureus* se exploró usando una biblioteca de péptidos de FRET para identificar sustratos fácilmente escindidos por proteasas secretadas. Los resultados de esta exploración mostraron que la inmensa mayoría de la actividad proteasa medida puede atribuirse a una cisteína proteasa secretada de *S. aureus*, estafopaina B. Los enlazadores peptídicos diseñados para la escisión por estafopaina B se optimizaron y se identificó un sustrato escindido de manera eficaz que liberaba antibiótico libre. El enlazador resultante también se escinde por la proteasa de *S. aureus* estafopaina A y por la proteasa humana cathepsina B, ambas también cisteína proteasas.

Cuando se conjuga con un anticuerpo que se une a *S. aureus*, el AAC resultante muestra eficacia tanto *in vitro* como *in vivo*. Las endopeptidasas endógenas de MRSA proporcionan un mecanismo para actuar de forma selectiva contra las infecciones por MRSA y liberar la carga útil de una manera específica de la enfermedad. La capacidad de este enlazador para ser escindido por proteasas secretadas de *S. aureus* permite actuar de forma selectiva contra MRSA presente tanto en neutrófilos humanos como extracelularmente en plasma/tejido del hospedador. Esta doble actuación de forma selectiva puede permitir la liberación de una alta concentración de antibiótico en los sitios de infección tanto intra como extracelulares.

La expresión de estafopaina A y B está regulada positivamente en los neutrófilos humanos y se cree que son factores de virulencia importantes (Burlak, C., et al. (2007) Cellular microbiology 9 (5): 1172-1190), lo que los convierte en dianas atractivas para la liberación de antibiótico mediada por proteasas. La cathepsina B humana también escinde el enlazador, presentando una vía alternativa de liberación. Es probable que la eficacia observada del AAC sea el resultado de múltiples proteasas, tanto de *S. aureus* como del hospedador, implicadas en la liberación de antibióticos o restos antibióticos. Un enlazador estable en suero que se escinde por varias proteasas proporciona un mecanismo de liberación que puede superar las mutaciones de resistencia de la bacteria.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE INFECCIONES CON CONJUGADOS ANTICUERPO-ANTIBIÓTICO

Los AAC de la invención son útiles como agentes antimicrobianos eficaces contra varias bacterias Gram positivas humanas y veterinarias, incluyendo los estafilococos, por ejemplo *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. simulans*; Listeria, por ejemplo, *Listeria monocytogenes*; Enterococos, por ejemplo *E. faecalis*; Estreptococos, por ejemplo *S. pneumoniae*; Clostridium, por ejemplo *C. difficile*.

La bacteriemia persistente puede ser el resultado de la internalización en las células hospedadoras. Si bien no se entiende por completo, los patógenos internalizados son capaces de escapar del reconocimiento inmunitario al sobrevivir dentro de las células hospedadoras. Dichos organismos incluyen *S. aureus*, *Salmonella* (por ejemplo, *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*), *Legionella* (p.ej, *L. pneumophila*), *Listeria* (p.ej, *L. monocytogenes*), *Brucella* (p.ej, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*), *Chlamydia* (*C. pneumoniae*, *C. trachomatis*), *Rickettsia spp.*, *Shigella* (e.g., *S. flexneri*), y *Mycobacteria*.

Después de la entrada en el torrente sanguíneo, *S. aureus* puede causar infección metastásica en casi cualquier órgano. Las infecciones secundarias se producen en aproximadamente un tercio de los casos antes del inicio de la terapia (Fowler et al., (2003) Arch. Intern. Med. 163: 2066-2072), e incluso en el 10 % de los pacientes después del inicio de la terapia (Khatib et al., (2006) Scand. J. Infect. Dis., 38:7-14). Las características distintivas de las infecciones son grandes reservorios de pus, destrucción de tejidos y formación de abscesos (todos los cuales contienen grandes cantidades de neutrófilos). Si bien solo aproximadamente el 5 % de los pacientes desarrollan complicaciones si la bacteriemia se extingue en 48 horas, los niveles se elevan al 40 %, si la bacteriemia persiste más de tres días.

Mientras *S. aureus* generalmente se considera un patógeno extracelular que secreta toxinas, existe evidencia de que puede sobrevivir dentro de las células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y osteoclastos (Alexander et al, (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:361-366; Garzoni et al, (2009) Trends Microbiol. 17:59-65). Los neutrófilos y los macrófagos son componentes clave de la respuesta inmunitaria innata del hospedador a la infección bacteriana. Estas células internalizan *S. aureus* por fagocitosis, que se puede potenciar por anticuerpos, complemento, o lectinas del hospedador tal como la proteína de unión a manosa, que pueden unirse simultáneamente a patógenos y neutrófilos, macrófagos y otros fagocitos profesionales. Como se ha mencionado previamente, *S. aureus* no solo sobrevive en el entorno lisosómico, si no que, en realidad, puede explotarlo como un mecanismo para desarrollar persistencia en el hospedador.

Los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) de la invención tienen ventajas terapéuticas significativas para el tratamiento de patógenos intracelulares, incluidos aquellos que residen en fagolisosomas. En una realización, el patógeno se internaliza en células leucocitarias y el componente intracelular es un fagolisosoma. En un AAC intacto, la región variable del anticuerpo se une a un antígeno de la superficie celular en la bacteria (opsonización). Sin estar limitado por ninguna teoría, en un mecanismo, por el componente de anticuerpo del AAC que se une a la superficie celular bacteriana, los fagocitos son atraídos por la bacteria. La porción Fc del anticuerpo se une a un receptor de Fc en el fagocito, facilitando la fagocitosis. Después de que el complejo AAC-bacteria sea fagocitado, al fusionarse con

el lisosoma, el enlazador de AAC se escinde por exposición a enzimas del fagolisosoma, liberando un antibiótico activo. Debido al espacio confinado y la concentración local de Abx relativamente alta (aproximadamente 10^4 por bacteria), el resultado es que el fagolisosoma ya no respalda la supervivencia del patógeno intracelular (Figura 5). Debido a que el AAC es esencialmente un profármaco inactivo, el índice terapéutico del antibiótico puede

extenderse con respecto a la forma libre (no conjugada). El anticuerpo proporciona una actuación selectiva específica del patógeno, mientras que el enlazador escindible se escinde en condiciones específicas de la ubicación intracelular del patógeno. El efecto puede ser tanto directamente sobre el patógeno opsonizado como sobre otros patógenos que se localizan conjuntamente en el fagolisosoma. En un aspecto específico, el patógeno es *S. aureus*.

La tolerancia a los antibióticos es la capacidad de un patógeno causante de enfermedad para resistir la destrucción por antibióticos y otros agentes antimicrobianos y es mecánicamente diferente de la resistencia a múltiples fármacos (Lewis K (2007). "Persister cells, dormancy and infectious disease". *Nature Reviews Microbiology* 5 (1): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557). En cambio, esta forma de tolerancia está causada por una pequeña subpoblación de células microbianas llamadas persistentes (Bigger JW (14 de octubre de 1944). "Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization". *Lancet* 244 (6320): 497-500). Estas células no son resistentes a múltiples fármacos en el sentido clásico, sino que, en cambio, son células latentes que son tolerantes al tratamiento con antibióticos que pueden destruir a sus hermanos genéticamente idénticos. Esta tolerancia a los antibióticos está inducida por un estado fisiológico de división no extremadamente lento. Cuando el tratamiento antimicrobiano no puede erradicar estas células persistentes, se convierten en un reservorio de infecciones crónicas recurrentes. Los conjugados anticuerpo-antibiótico de la invención poseen una propiedad exclusiva para destruir estas células persistentes y suprimir la aparición de poblaciones bacterianas tolerantes a múltiples fármacos.

En otra realización, los AAC de la invención pueden usarse para tratar la infección independientemente del compartimento intracelular en el que sobrevive el patógeno.

En otra realización, los AAC también podrían usarse para actuar de forma selectiva contra las bacterias en forma de plancton o biopelícula (ejemplo: *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*) por opsonización mediada por anticuerpos, conduciendo a la internalización por fagocitos profesionales. Cuando el fagosoma se fusiona con un lisosoma, se liberarán concentraciones suficientemente altas de antibiótico libre del AAC en el ambiente ácido o proteolítico del fagolisosoma para destruir el patógeno fagocitado.

Los métodos para tratar la infección con conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) de la invención incluyen tratar infecciones pulmonares bacterianas, tales como la neumonía o infecciones de tuberculosis por *S. aureus*, infecciones oculares bacterianas, tal como el tracoma y la conjuntivitis, infecciones de corazón, cerebrales o cutáneas, infecciones del tracto gastrointestinal, tales como la diarrea de los viajeros, osteomielitis, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable (SII), Enfermedad de Crohn y EII (enfermedad inflamatoria intestinal) en general, meningitis bacteriana y abscesos en cualquier órgano, tal como músculo, hígado, meninges o pulmón. Las infecciones bacterianas pueden estar en otras partes del cuerpo como el tracto urinario, el torrente sanguíneo, una herida o un sitio de inserción de catéter. Los AAC de la invención son útiles para infecciones difíciles de tratar que implican biopelículas, implantes o sitios santuarios (por ejemplo, osteomielitis e infecciones de prótesis articulares) e infecciones de alta mortalidad como neumonía y bacteremia adquirida en el hospital. Los grupos de pacientes vulnerables que pueden tratarse para prevenir la infección por *Staphylococcus aureus* incluyen pacientes con hemodiálisis, pacientes inmunocomprometidos, pacientes en unidades de cuidados intensivos y determinados pacientes quirúrgicos. En otro aspecto, la invención proporciona un método para destruir, tratar o prevenir una infección microbiana en un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente, un ser humano, que incluye administrar al animal un AAC o formulación farmacéutica de un AAC de la invención. La invención presenta además el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con o que de manera oportunista son el resultado de tales infecciones microbianas. Dichos métodos de tratamiento o prevención pueden incluir la administración oral, tópica, intravenosa, intramuscular o subcutánea de una composición de la invención. Por ejemplo, antes de la cirugía o la inserción de un catéter IV, en cuidados de UCI, en medicina de trasplante, con o después de la quimioterapia contra el cáncer u otras actividades que conlleven un alto riesgo de infección, los AAC de la invención puede administrarse para prevenir la aparición o propagación de la infección.

La infección bacteriana puede estar causada por una bacteria con una forma activa e inactiva, y el AAC se administra en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar tanto a la forma activa como la inactiva, latente de la infección bacteriana, cuya duración es más larga de lo necesario para tratar la forma activa de la infección bacteriana.

El análisis de varias bacterias Gram+ encontró WTA beta expresada en todos los *S. aureus*, incluidas las cepas MRSA y MSSA, así como cepas de estafilococos no aureus tales como *S. saprophyticus* y *S. simulans*. WTA alfa (Alfa-GLcNAc ribitol WTA) está presente en la mayoría, pero no todos los *S. aureus*, y también están presentes en *Listeria monocytogenes*. WTA no está presente en bacterias Gram-. Por lo tanto, un aspecto de la invención es un método para tratar a un paciente infectado con *S. aureus* o *S. saprophyticus* o *S. simulans* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAC anti-WTA beta de la invención. Otro aspecto de la invención es un método para tratar a un paciente infectado con *S. aureus* o *Listeria monocytogenes* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAC anti-WTA alfa de la invención. La invención

también contempla un método para prevenir infecciones por *S. aureus* o *S. saprophyticus* o *S. simulans* mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAC anti-WTA beta de la invención en situaciones hospitalarias tales como cirugía, paciente quemado y trasplante de órganos.

- 5 El paciente que necesita tratamiento para una infección bacteriana, según lo determinado por un médico experto en la materia, puede haber sido ya diagnosticado, aunque no necesariamente, con el tipo de bacteria con la que está infectado. Debido a que un paciente con una infección bacteriana puede empeorar muy rápidamente, en cuestión de horas, al paciente ingresado en el hospital se le pueden administrar los AAC anti-WTA de la invención junto con uno o más Abx de tratamiento de referencia tal como la vancomicina. Cuando los resultados de diagnóstico estén disponibles e indiquen la presencia de, por ejemplo, *S. aureus* en la infección, el paciente puede continuar con el tratamiento con el AAC anti-WTA. Por lo tanto, en una realización del método de tratamiento de una infección bacteriana o específicamente una infección por *S. aureus*, al paciente se le administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un AAC anti-WTA beta. En los métodos de tratamiento o prevención de la presente invención, un AAC de la invención puede administrarse como el único agente terapéutico o en combinación con otros agentes tales como los descritos a continuación. Los AAC de la invención muestran superioridad a la vancomicina en el tratamiento de MRSA en modelos preclínicos. La comparación de AAC con SOC se puede medir, por ejemplo, mediante una tasa de reducción de la mortalidad. Se evaluaría la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento con AAC mediante varios factores medibles. Ejemplos de signos y síntomas que los médicos podrían usar para evaluar la mejora en sus pacientes incluyen los siguientes: normalización del recuento de glóbulos blancos si está elevado en el momento del diagnóstico, normalización de la temperatura corporal si está elevada (fiebre) al momento del diagnóstico, aclaramiento de hemocultivos, mejora visual en la herida, incluido menos eritema y drenaje de pus, reducción en los requisitos de respirador, tales como requerir menos oxígeno o una tasa reducida de ventilación en un paciente que está ventilado, salir completamente del respirador si el paciente está ventilado en el momento del diagnóstico, uso de menos medicamentos para mantener una presión sanguínea estable si estos medicamentos fueran necesarios al momento del diagnóstico, normalización de anomalías de laboratorio que sugieren fallo del órgano terminal, tal como creatinina elevada o pruebas de función hepática si eran anormales en el momento del diagnóstico, y mejoría en las imágenes radiológicas (por ejemplo, radiografía de tórax que previamente sugirió una neumonía que mostraba resolución). En un paciente en la UCI, estos factores podrían medirse al menos diariamente. La fiebre se monitoriza de cerca, al igual que el recuento de glóbulos blancos, incluidos los recuentos absolutos de neutrófilos, así como la evidencia de que se ha resuelto un "desplazamiento a la izquierda" (aparición de blastos que indican una mayor producción de neutrófilos en respuesta a una infección activa).

En el contexto de los presentes métodos de tratamiento de la invención, un paciente con una infección bacteriana se considera tratado si hay una mejora significativa medible según lo evaluado por el médico experto en la materia, en al menos dos o más de los factores anteriores en comparación con los valores, signos o síntomas antes o al inicio del tratamiento o al momento del diagnóstico. En algunas realizaciones, hay una mejora medible en 3, 4, 5, 6 o más de los factores anteriormente mencionados. En algunas realizaciones, la mejora en los factores medidos es de al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con los valores antes del tratamiento. Generalmente, un paciente puede considerarse completamente tratado de la infección bacteriana (por ejemplo, infección por *S. aureus*) si las mejoras medibles del paciente incluyen lo siguiente: i) repetir cultivos de sangre o tejidos (generalmente varios) que no producen la bacteria que se identificó originalmente; ii) la fiebre está normalizada; iii) los WBC (glóbulos blancos) están normalizados; y iv) la evidencia de fallo del órgano terminal (pulmones, hígado, riñones, colapso vascular) se ha resuelto total o parcialmente debido a las comorbilidades preexistentes que tenía el paciente.

45 Dosificación

En cualquiera de los aspectos anteriores, en el tratamiento de un paciente infectado, la dosis de un AAC es normalmente de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg/día. En una realización, el paciente con una infección bacteriana se trata a una dosis de AAC en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, generalmente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg, más específicamente de 10 mg/kg a 50 mg/kg. El AAC se puede administrar diariamente (por ejemplo, una dosis única de 5 a 50 mg/kg/día) o con menos frecuencia (por ejemplo, una dosis única de 5, 12,5 o 25 mg/kg/semana). Una dosis puede dividirse en 2 días, por ejemplo, 25 mg/kg en un día y 25 mg/kg al día siguiente. Al paciente se le puede administrar una dosis una vez cada 3 días (q3D), una vez por semana a cada dos semanas (qOW), por una duración de 1-8 semanas. En una realización, al paciente se le administra un AAC de la invención por vía intravenosa una vez por semana durante 2-6 semanas con tratamiento de referencia (SOC) para tratar la infección bacteriana, tal como la infección por estafilococo A. La duración del tratamiento dependería de la afección del paciente o la extensión de la infección, por ejemplo, una duración de 2 semanas para bacteriemia no complicada, o 6 semanas para bacteriemia con endocarditis.

En una realización, se administra un AAC a una dosis inicial de 2,5 a 100 mg/kg durante uno a siete días consecutivos, seguido de una dosis de mantenimiento de 0,005 a 10 mg/kg una vez cada uno a siete días durante un mes.

65 Vía de administración

Para tratar las infecciones bacterianas, los AAC de la invención pueden administrarse a cualquiera de las dosificaciones anteriores por vía intravenosa (iv) o subcutánea. En una realización, el AAC de WTA se administra por vía intravenosa. En una realización específica, el AAC de WTA administrado por vía i.v. es un AAC de WTA-beta, más específicamente, en donde el anticuerpo de WTA-beta es uno seleccionado del grupo de Ac con secuencias de aminoácidos como se describe en la Figura 14, Figuras 15A, Figura 15B, Figura 16A y Figura 16B.

Terapia de combinación

- 10 Un AAC puede administrarse junto con uno o más agentes adicionales, por ejemplo, segundos agentes terapéuticos o profilácticos según corresponda según lo determine el médico que trata al paciente.

En una realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención se selecciona de las clases estructurales: (i) aminoglucósidos; (ii) betalactámicos; (iii) macrólidos/péptidos cíclicos; (iv) tetraciclinas; (v) fluoroquinolonas/fluoroquinolonas; (vi) y oxazolidinonas. Véanse: Shaw, K. y Barbachyn, M. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:48-70; Sutcliffe, J. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:122-152.

20 En una realización, el segundo antibiótico administrado en combinación con el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la invención se selecciona de clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK-2140944, CG-400549, sitafloxacin, teicoplanina, triclosán, naftiridona, radezolida, doxorubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina y azitromicina.

Ejemplos adicionales de estos agentes terapéuticos o profilácticos adicionales son agentes antiinflamatorios (por ejemplo, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); por ejemplo, detoprofeno, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, tolmetina, celecoxib, rofecoxib, aspirina, salicilato de colina, salsalato y salicilato de sodio y magnesio) y esteroides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona)), agentes antibacterianos (por ejemplo, azitromicina, claritromicina, eritromicina, gatifloxacino, levofloxacino, amoxicilina, metronidazol, penicilina G, penicilina V, metilicina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ampicilina, carbenicilina, ticarcilina, mezlocilina, piperacilina, azlocilina, temocilina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefamandol, cefuroxima, cefalexina, cefprozilo, cefaclor, loracarbef, cefoxitina, cefmatozol, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefoperazona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima, ceftibuteno, cefdinir, cefpiroma, cefepima, BAL5788, BAL9141, imipenem, ertapenem, meropenem, astreonam, clavulanato, sulbactam, tazobactam, estreptomina, neomicina, kanamicina, paromomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, espectinomicina, sisomicina, dibecalina, isepamicina, tetraciclina, clortetraciclina, desmeclociclina, minociclina, oxitetraciclina, metaciclina, doxiciclina, telitromicina, ABT-773, lincomicina, clindamicina, vancomicina, oritavancina, dalbavancina, teicoplanina, quinupristina y dalopristina, sulfanilamida, ácido paraaminobenzoico, sulfadiazina, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfatidina, linezolid, ácido nalidixico, ácido oxolínico, norfloxacino, perfloxacina, enoxacino, ofloxacino, ciprofloxacino, temafloxacino, lomefloxacino, fleroxacin, grepafloxacino, esparfloxacino, trovafloxacino, clinafloxacino, moxifloxacino, gemifloxacino, sitafloxacino, daptomicina, garenoxacina, ramoplanina, faropenem, polimixina, tigeciclina, AZD2563 o trimetoprima), anticuerpos antibacterianos, incluidos anticuerpos contra el mismo o diferente antígeno del Ag dirigido de AAC, inhibidores de la agregación plaquetaria (por ejemplo, abciximab, aspirina, cilostazol, clopidogrel, dipiridamol, eptifibatida, ticlopidina o tirofiban), anticoagulantes (por ejemplo, dalteparina, danaparoid, enoxaparina, heparina, tinzaparina o warfarina), antipiréticos (por ejemplo, paracetamol) o agentes hipolipemiantes (por ejemplo, colestiramina, colestipol, ácido nicotínico, gemfibrozilo, probucol, ezetimiba, o estatinas tales como atorvastatina, rosuvastatina, lovastatina simvastatina, pravastatina, cerivastatina y fluvastatina). En una realización, el AAC de la invención se administra en combinación con el tratamiento de referencia (SOC) para *S. aureus* (incluyendo cepas resistentes a metilicina y sensibles a metilicina). El MSSA habitualmente se trata con nafcilina u oxacilina y el MRSA generalmente se trata con vancomicina o cefazolina.

Estos agentes adicionales pueden administrarse dentro de los 14 días, 7 días, 1 día, 12 horas, o 1 hora de administración de un AAC, o de manera simultánea con el mismo. Los agentes terapéuticos adicionales pueden estar presentes en las mismas o diferentes composiciones farmacéuticas que un AAC. Cuando están presente en diferentes composiciones farmacéuticas, pueden usarse diferentes vías de administración. Por ejemplo, un AAC puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea, mientras que un segundo agente puede administrarse por vía oral.

60 FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen el AAC y métodos para tratar una infección bacteriana usando las composiciones farmacéuticas que contienen AAC. Dichas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables, incluidos tampones, ácidos, bases, azúcares, diluyentes, sustancias de deslizamiento, conservantes y similares, que son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Los presentes métodos y

composiciones se pueden usar solos o en combinación con otros métodos y/o agentes convencionales para tratar enfermedades infecciosas. En un aspecto, la invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo de la invención y/o al menos un conjugado anticuerpo-antibiótico (AAC) del mismo. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo de la invención y/o un AAC del mismo, y 2) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una formulación farmacéutica comprende 1) un anticuerpo de la invención y/o un AAC del mismo, y opcionalmente, 2) al menos un agente terapéutico adicional.

Las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o AAC de la invención se preparan para almacenamiento mezclando el anticuerpo o AAC que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de soluciones acuosas o liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio); fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones farmacéuticas que se van a usar para la administración *in vivo* son, generalmente, estériles, esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Los principios activos pueden inmovilizarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo o AAC de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etilvinilacetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como las LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como etilvinilacetato y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados o AAC permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden crear estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Se puede formular un anticuerpo en cualquier forma adecuada para la administración a una célula/tejido diana. Por ejemplo, los anticuerpos pueden formularse como liposomas, una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que son útiles para suministrar un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma habitualmente están dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; documento US 4485045; documento US 4544545; documento WO 97/38731; documento US 5013556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas como se describe en Martin et al., (1982) J. Biol. Chem. 257:286-288) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapéutico está opcionalmente contenido dentro del liposoma (Gabizon et al., (1989) J. National Cancer Inst. 81(19):1484).

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA DIAGNÓSTICOS Y DETECCIÓN

En determinadas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de MRSA en una muestra biológica. El término "detectar", como se usa en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. Una "muestra biológica" comprende, por ejemplo, sangre, suero, plasma, tejido, esputo, aspirado, hisopo, etc.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-WTA para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de WTA en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-WTA como se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo anti-WTA a WTA, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-WTA y WTA en la muestra biológica. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una realización, se usa un anticuerpo anti-MRSA para seleccionar sujetos elegibles para la terapia con un anticuerpo anti-MRSA, por ejemplo, donde MRSA es un biomarcador para la selección de pacientes.

En una realización a modo de ejemplo, se usa un anticuerpo anti-WTA *in vivo* para detectar, por ejemplo, por obtención de imágenes *in vivo*, una infección por MRSA positiva en un sujeto, por ejemplo, para fines de diagnóstico, pronóstico o tratamiento de estadificación de una infección, para determinar el curso apropiado de la terapia, o monitorizar la respuesta de la infección a la terapia. Un método conocido en la técnica para la detección *in vivo* es la tomografía por emisión de inmuno positrones (inmuno-PET), como se describe, por ejemplo, en van Dongen et al., (2007) The Oncologist 12:1379-1389 y Verel et al., (2003) J. Nucl. Med. 44:1271-1281. En dichas realizaciones, se proporciona un método para detectar una infección por estafilococos positiva en un sujeto, comprendiendo, el método, administrar un anticuerpo anti-estafilococo marcado a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene una infección por estafilococo positiva, y detectar el anticuerpo antiestafilococo marcado en el sujeto, en donde la detección del anticuerpo antiestafilococo marcado indica una infección por estafilococo positiva en el sujeto. En determinadas de estas realizaciones, el anticuerpo antiestafilococo marcado comprende un anticuerpo antiestafilococo conjugado con un emisor de positrones, tal como ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr e ^{124}I . En una realización particular, el emisor de positrones es ^{89}Zr .

En realizaciones adicionales, un método de diagnóstico o detección comprende poner en contacto un primer anticuerpo antiestafilococo inmovilizado en un sustrato con una muestra biológica para analizar la presencia de estafilococos, exponiendo el sustrato a un segundo anticuerpo antiestafilococo y detectando si el segundo anticuerpo antiestafilococo está unido a un complejo entre el primer anticuerpo antiestafilococo y estafilococos en la muestra biológica. Un sustrato puede ser cualquier medio de soporte, por ejemplo, vidrio, metal, cerámica, perlas poliméricas, portaobjetos, chips y otros sustratos. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o un tejido (p.ej., material de biopsia, incluyendo tejido colorrectal canceroso o potencialmente canceroso, del endometrio, pancreático u ovárico). En determinadas realizaciones, el primer o segundo anticuerpo antiestafilococo es cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En dichas realizaciones, el segundo anticuerpo anti-WTA puede ser los anticuerpos anti-WTA S4497, S4462, S6978, S4487, o anticuerpos derivados de ellos como se describe en el presente documento.

Los trastornos a modo de ejemplo que pueden diagnosticarse o detectarse de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluyen infección positiva por MRSA, utilizando pruebas como la inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) o hibridación in situ (ISH, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, una infección por estafilococo positiva es una infección que expresa estafilococos de acuerdo con un ensayo de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) que detecta el ARNm de estafilococos. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa (Francois P y Schrenzel J (2008). "Rapid Diagnosis and Typing of Staphylococcus aureus". Staphylococcus: Molecular Genetics. Caister Academic Press; Mackay IM, ed. (2007)) y PCR en tiempo real ("Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press).

En determinadas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-ácido teicoico de pared (WTA) marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tal como marcadores fluorescentes, cromofóricos, de densidad de electrones, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H e ^{131}I , fluoróforos tales como quelatos de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferinas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (documento US 4737456), luciferina, 2,3-dihidroftalacinadionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas como uricasa y xantina oxidasa, junto con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, y similares. En otra realización, un marcador es un emisor de positrones. Los emisores de positrones incluyen, entre otros, ^{68}G , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr e ^{124}I . En una realización particular, un emisor de positrones es ^{89}Zr .

Clínicamente, los síntomas de las infecciones por MRSA son similares a los del *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA) e incluyen abscesos y celulitis. Con frecuencia, los abscesos van acompañados de áreas de necrosis central. Los forúnculos (furúnculos) también son comunes, particularmente en el contexto de un brote de MRSA. Las lesiones también pueden describirse erróneamente como una picadura de araña debido al enrojecimiento general que progresa a un centro necrótico. Adicionalmente, las infecciones pueden aparecer como impétigo, foliculitis, abscesos profundos, piomiositis, osteomielitis, fascitis necrotizante, síndrome de shock tóxico estafilocócico, neumonía y sepsis. Las infecciones sistémicas graves son más habituales entre las personas con antecedentes de uso de fármacos inyectables, diabetes u otras afecciones inmunocomprometidas.

Las opciones de tratamiento convencional para las infecciones por MRSA incluyen opciones mecánicas conservadoras, tales como: (i) baños calientes y compresas, (ii) incisión y drenaje, y (iii) extracción del dispositivo extraño (por ejemplo, catéter) que causa la infección. Para infecciones más graves, especialmente aquellas que presentan celulitis, se prescriben antibióticos (Abx). Para infecciones leves a moderadas, los antibióticos incluyen trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), clindamicina, doxiciclina, minociclina, tetraciclina, rifampina, vancomicina, linezolid. Generalmente, se produce un régimen de tratamiento durante 5-10 con reexaminación y evaluación periódica tanto durante como después del período de tratamiento.

Las opciones de tratamiento adicionales incluyen descolonización, especialmente en el entorno donde un paciente experimenta una infección recurrente o donde se encuentra en un entorno donde está en curso un brote de MRSA. La descolonización es un procedimiento en el que se elimina la flora que inhibe las narinas del paciente. Esto se realiza mediante la aplicación tópica de ungüento de mupirocina al 2 % aplicado generosamente en ambas fosas nasales durante 5-10 días y la limpieza tópica con gluconato de clorhexidina al 4 % durante 5 días.

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolsas de solución IV, etc. Los envases pueden formarse a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que está sola o combinada con otra composición eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar el trastorno y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que es perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un anticuerpo o inmunoconjugado de la invención; y (b) un segundo envase con una composición contenida en este, en donde la composición comprende un agente citotóxico o de otro modo terapéutico adicional. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender adicionalmente un prospecto que indica que las composiciones pueden usarse para tratar una afección concreta. Como alternativa o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), por sus siglas en inglés), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Ejemplos

Lo siguiente son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica varias realizaciones diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplo 1 MC-vc-PAB-pipBOR 51

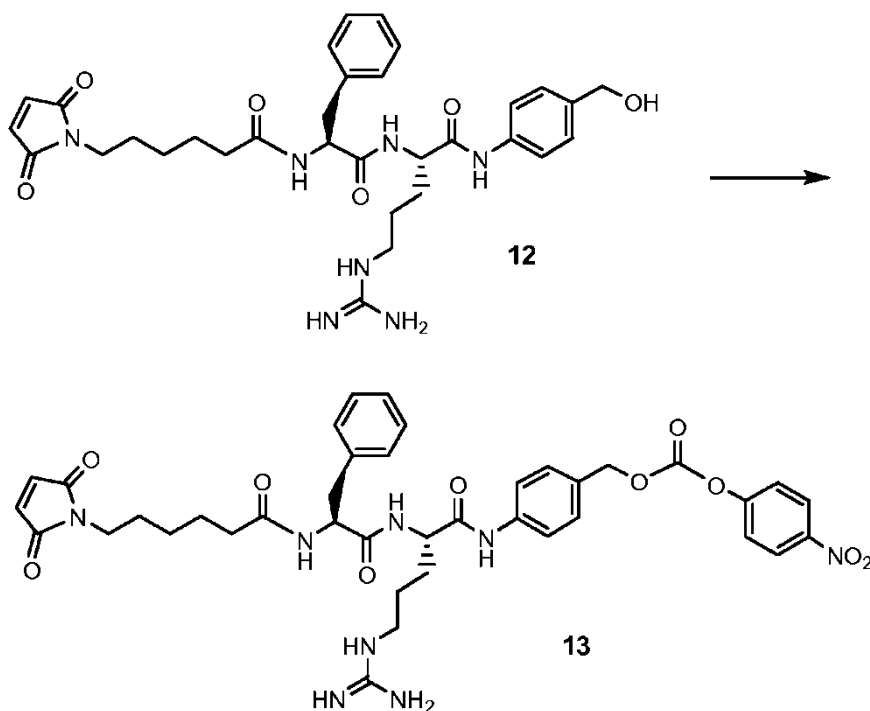
Se hidrogenó 2-nitrobenceno-1,3-diol **1** en hidrógeno gaseoso con catalizador de paladio/carbono en disolvente de etanol para dar 2-aminobenceno-1,3-diol **2**, aislado como la sal de hidrocloreto (Figuras 23A y 23B). La monoprotección de **2** con cloruro de terc-butildimetilsililo y trietilamina en diclorometano/tetrahidrofurano dio 2-amino-3-(terc-butildimetilsililo)fenol **3**. LA rifamicina S (ChemShuttle Inc., Fremont, CA, documento US 7342011; documento US 7271165; documento US 7547692) se hizo reaccionar con **3** por condensación oxidativa con óxido de manganeso u oxígeno gaseoso en tolueno a temperatura ambiente para dar benzoxazina rifamicina protegida con TBS **4**. La reacción de **4** con piperidin-4-amina y óxido de manganeso dio piperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **5**.

Se mezclaron piperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil 4-nitrofenil carbonato **6** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT, por sus siglas en inglés). A esto se añadieron 2,5 equivalentes de N,N'-diisopropiletilamina. La solución se agitó de una a aproximadamente 12 horas y se monitorizó por LC/MS. Tras

completarse, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones ácidas para dar MC-vc-PAB-pipBOR **51**. M/Z = 1498,9. Rendimiento 40 %

Ejemplo 2 MC-fk-PAB-pipBOR **52**

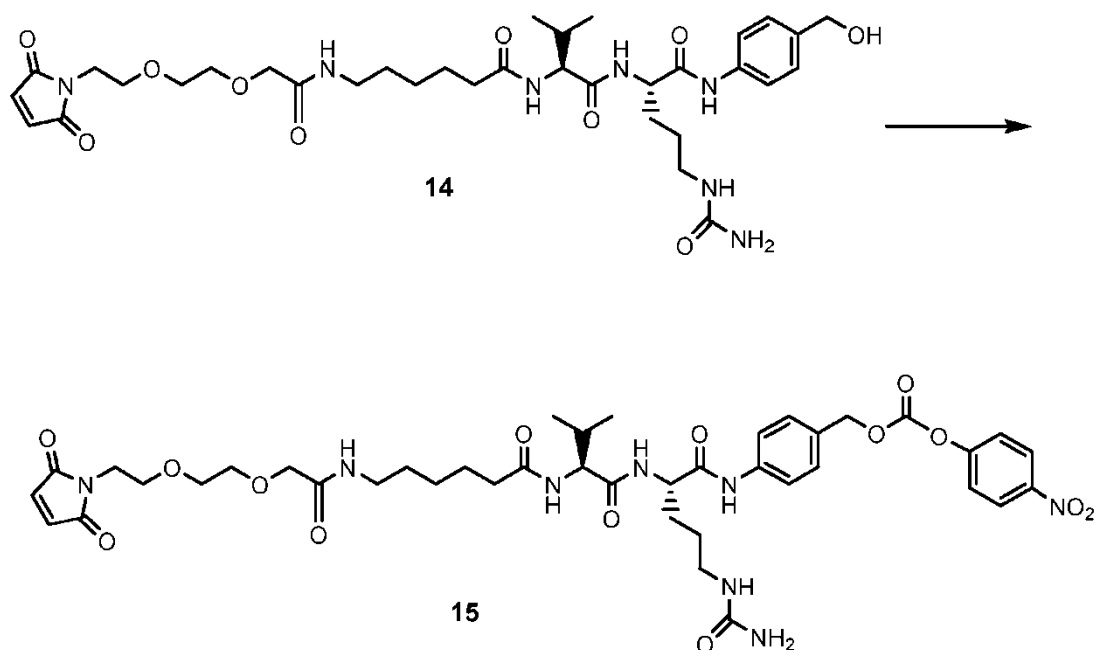
Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, 6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-((S)-5-guanidino-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)hexanamida **12** se convirtió en 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) hexanamido)-3-fenilpropanamido)-5-guanidinopentanamido)benzil 4-nitrofenil carbonato **13**.



Se mezclaron benzoxazina rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y **13** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT). A esto se añadieron 2,5 equivalentes de N,N'-diisopropiletilamina. La solución se agitó de una a aproximadamente 12 horas y se monitorizó por LC/MS. Tras completarse, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones ácidas para dar MC-fk-PAB-pipBOR **52**. M/Z = 1545,8. Rendimiento 32 %

Ejemplo 3 MP-vc-PAB-pipBOR **53**

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, 6-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi) acetamido)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida **14** se convirtió en 4-((17S, 20S)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-17-isopropil-8,15,18-trioxo-20-(3-ureidopropil)-3,6-dioxa-9,16,19-triazahenicosanamido)benzil 4-nitrofenil carbonato **15**.



Se mezclaron piperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **5** (0,02 mmol) y **15** (0,02 mmol) en DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente (RT). A esto se añadieron 2,5 equivalentes de N,N'-diisopropiletilamina. La solución se agitó de una a aproximadamente 12 horas y se monitorizó por LC/MS. Tras completarse, la solución se diluyó con DMF y se inyectó en HPLC y se purificó en condiciones ácidas para dar MP-vc-PAB-pipBOR **53**. M/Z = 1644,8. Rendimiento 57 %

Ejemplo 4 MC-vc-PAB-dimetilpipBOR **54**

La reacción de N,N-dimetilpiperidin-4-amina con benzoxazina rifamicina protegida con TBS **4** dio dimetilpiperidil benzoxazina rifamicina (dimetil pipBOR) **7** (Figura 24).

Alternativamente, se hidrogenó (5-fluoro-2-nitro-1,3-fenileno)bis(oxi)bis(metileno)dibenceno **9** en hidrógeno gaseoso con catalizador de paladio/carbono en disolvente de tetrahidrofurano/metanol para eliminar los grupos bencilo para dar 2-amino-5-fluorobenceno-1,3-diol **10**. Se hizo reaccionar rifamicina S o sal de sodio de Rifamicina SV disponibles comercialmente (ChemShuttle Inc., Fremont, CA) con 2-amino-5-fluorobenceno-1,3-diol **10** por condensación oxidativa en aire o cianuro férrico de potasio en acetato de etilo a 60 °C para dar fluorobenzoxazina rifamicina **11**. El desplazamiento de fluoro con N,N-dimetilpiperidin-4-amina dio dimetil pipBOR **7** (Figuras 25A y 25B).

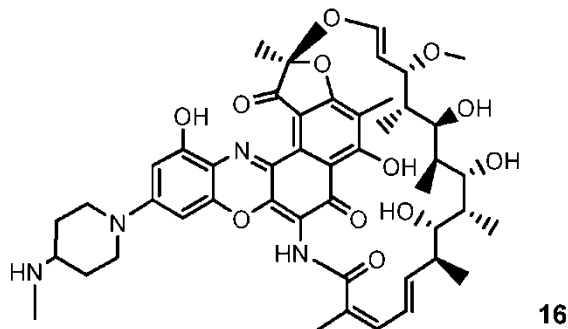
El 6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)hexanamida **8**, preparada de acuerdo con los procedimientos en el documento WO 2012113847; documento US 7659241; documento US 7498298; documento US 20090111756; documento US 20090018086; documento US 6214345; Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13 (4): 855-869 (1,009 g, 1,762 mmol, 1,000, 1009 mg) se incorporó en N,N-dimetilformamida (6 ml, 77 mmol, 44, 5700 mg). A esto se le añadió una solución de cloruro de tionilo (1,1 equivalentes, 1,938 mmol, 1,100, 231 mg) en diclorometano (DCM) (1 ml, 15,44 mmol, 8,765, 1325 mg) en porciones gota a gota (1/2 se añadió durante 1 hora, se agitó una hora a temperatura ambiente (RT) y después se añadió la otra mitad durante más de otra hora). La solución permaneció de color amarillo. Se añadieron otros 0,6 equivalentes de cloruro de tionilo como una solución en 0,5 ml de DCM gota a gota, cuidadosamente. La reacción permaneció de color amarillos y se agitó sellada durante la noche a RT. La reacción se monitorizó por LC/MS al 88 % de cloruro de bencilo producto **9**. Se añadieron gota a gota otros 0,22 equivalentes de cloruro de tionilo como una solución en 0,3 ml de DCM. Cuando la reacción se acercó al 92 % de cloruro de bencilo **9**, la reacción se sometió a burbujeo con N₂. La concentración se redujo de 0,3 M a 0,6 M. El producto N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9** se almacenó en el refrigerador como una solución 0,6 M y se usó como está. M/Z 591,3, 92 % de rendimiento.

En un matraz, N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9**, (0,9 mmol) se enfrió a 0 °C y se añadió dimetilpiperidil benzoxazina rifamicina (dimetil pipBOR) **7** (0,75 g, 0,81 mmol, 0,46, 750 mg). La mezcla se diluyó con otros 1,5 ml de DMF para alcanzar 0,3 M. Se agitó al aire durante 30 minutos. Se añadió N, N-diisopropiletilamina (3,5 mmol, 3,5 mmol, 2,0, 460 mg) y la reacción se agitó durante la noche al aire. En el transcurso de 4 días, se añadieron 4 adiciones de 0,2 equivalentes de N, N-diisopropiletilamina base mientras la reacción se agitaba al aire, hasta que la reacción pareció dejar de progresar. La reacción se diluyó con DMF y se purificó en HPLC (20-60 % ACN/FA·H₂O)

en varios lotes para dar MC-vc-PAB-dimetilpipBOR **54**.
M/Z = 1482.8 rendimiento: 32 %

Ejemplo 5 MC-vc-PAB-monometilpip, desacetilBOR **55**

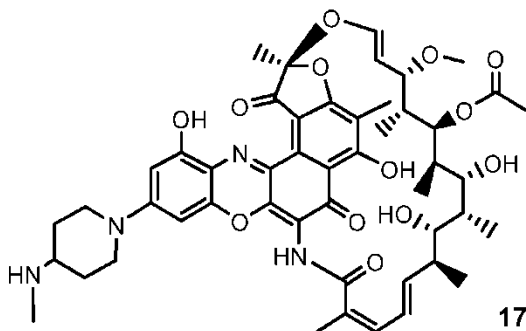
Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hicieron reaccionar N-metilpiperidin-4-amina y desacetil benzoxazina rifamicina protegida con TBS con óxido de manganeso para dar monometilpiperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **16**.



Se hicieron reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** y **16** para dar MC-vc-PAB-monometilpip, desacetilBOR **55** con un rendimiento del 26% (M/Z = 1456,5).

Ejemplo 6 MC-vc-PAB-monometilpipBOR **56**

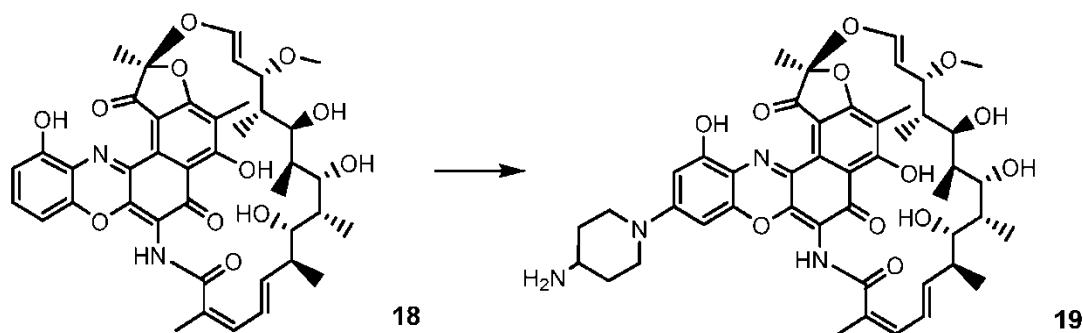
Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hicieron reaccionar N-metilpiperidin-4-amina y benzoxazina rifamicina protegida con TBS **4** con óxido de manganeso para dar monometilpiperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **17**.



Se hicieron reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** y **17** para dar MC-vc-PAB-monometilpipBOR **56** con un 25 % de rendimiento (M/Z = 1471,0).

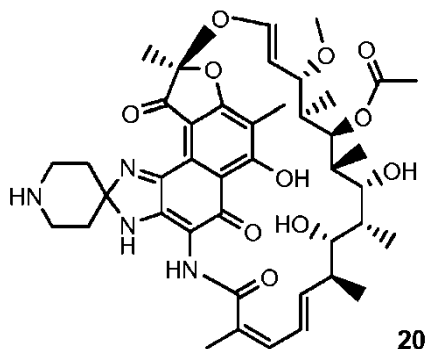
Ejemplo 7 MC-vc-PAB-pip, desacetilBOR **57**

Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hicieron reaccionar piperidin-4-amina y desacetil benzoxazina rifamicina protegida con TBS **18** con óxido de manganeso para dar piperidil, desacetil benzoxazina rifamicina (pip desacetil BOR) **19**.



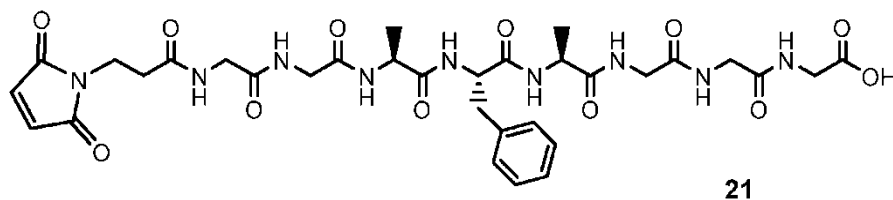
Se hicieron reaccionar piperidil, desacetil benzoxazina rifamicina **19** (0,02 mmol) y 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** (0,02 mmol) para dar MC-vc-PAB-pip, desacetilBOR 57. M/Z = 1456,6. Rendimiento 13 %

Ejemplo 8 MC-vc-PAB-rifabutina **58**



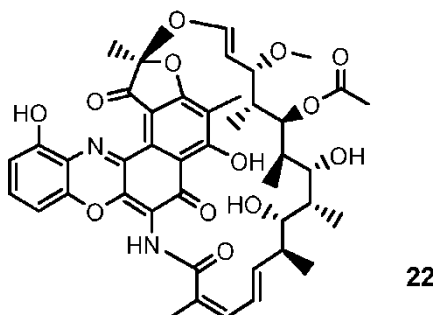
Seguendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hicieron reaccionar desisobutil rifabutina **20** (0,02 mmol) y 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** (0,02 mmol) para dar MC-vc-PAB-rifabutina **58**. M/Z = 1389,6. Rendimiento 21 %

Ejemplo 9 MC-GGAFAGGG-pipBOR ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) **59**



Seguendo los procedimientos del Ejemplo 1, se acopló péptido maleimida **21** con piperidil benzoxazina rifamicina (pipBOR) **5** en condiciones convencionales de formación de enlaces amida para dar MC-GGAFAGGG-pipBOR ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) **59**. M/Z = 1626,0. Rendimiento 13 %

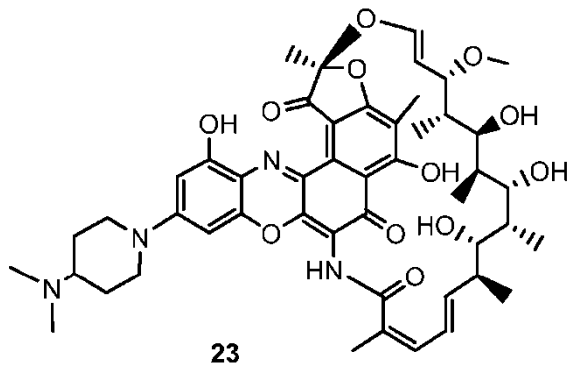
Ejemplo 10 MC-vc-PAB-rif **60**



En un vial pequeño, 0,05 ml de una solución 0,6 M de N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-

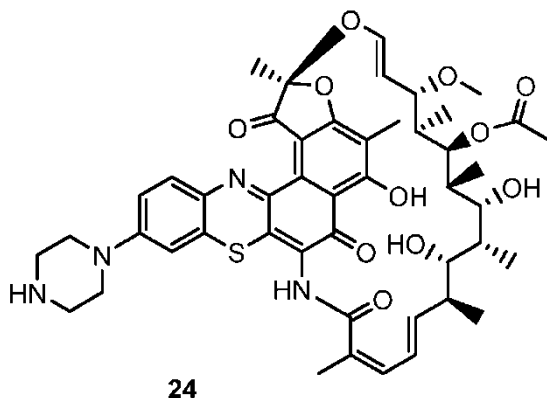
ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9**, preparada por el procedimiento del Ejemplo 4 se enfrió a 0 °C y se añadió 1 equivalente de benzoxazina rifamicina **22** y la mezcla se agitó durante 5 minutos. A esta solución a 0 °C se le añadió K₂CO₃ (15 equivalentes) y los lados del vial se lavaron con 0,05 ml de DMF. La reacción se agitó al aire a temperatura ambiente durante 1-4 horas. Cuando la totalidad de **9** se consumió, los sólidos se filtraron y el filtrado recogido se diluyó con DMF. La purificación por HPLC dio MC-vc-PAB-rif **60** con un rendimiento del 11 % (M/Z = 1356,9).

Ejemplo 11 MC-vc-PAB-dimetilpip, desacetilBOR **61**



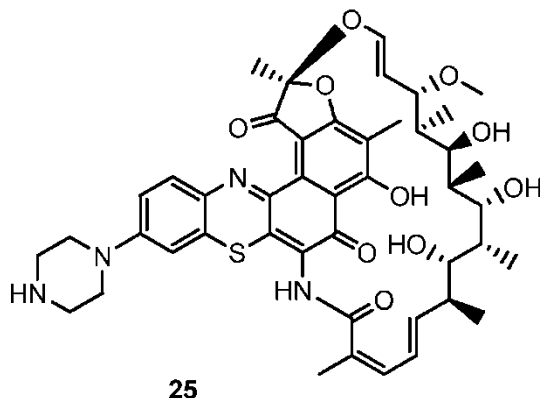
Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 4, se hizo reaccionar N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9** con dimetilpiperidil, desacetil benzoxazina rifamicina (dimetil, desacetil pipBOR) **23** para dar MC-vc-PAB-dimetilpip, desacetilBOR **61**. M/Z = 1440,66

Ejemplo 12 MC-vc-PAB-piperazBTR **62**



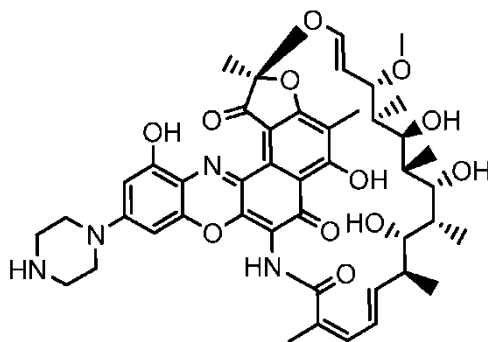
Siguiendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil 4-nitrofenil carbonato **6** con piperazino benztiazzino rifamicina (piperazBTR) **24** dar MC-vc-PAB-piperazBTR **62**. M/Z = 1483,7

Ejemplo 13 MC-vc-PAB-piperaz, desacetilBTR **63**



Seguendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** con piperazino, desacetil benzitiazina rifamicina (pipBTR) **25** para dar MC-vc-PAB-piperaz, desacetilBTR **63**. M/Z = 1441,6

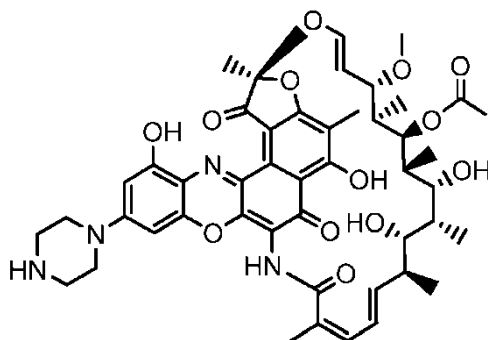
Ejemplo 14 MC-vc-PAB-piperaz, desacetilBOR **64**



26

Seguendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** con piperazilo, desacetil benzoxazina rifamicina (desacetil pipBOR) **26** para dar MC-vc-PAB-piperaz, desacetilBOR **64**. M/Z = 1441,6

Ejemplo 15 MC-vc-PAB-piperazBOR **65**

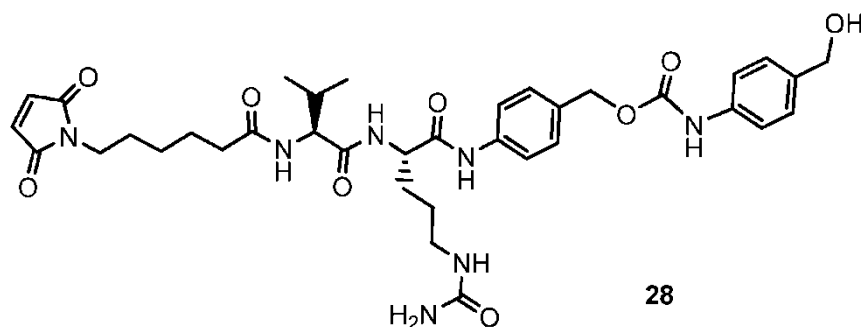


27

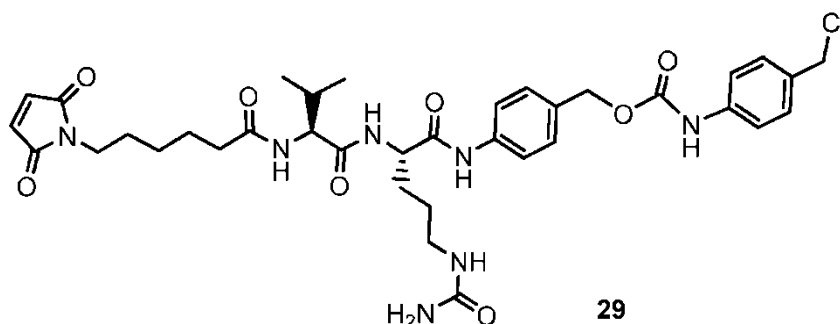
Seguendo los procedimientos del Ejemplo 1, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** con piperazil benzoxazina rifamicina (piperazilBOR) **27** para dar MC-vc-PAB-piperazBOR **65**. M/Z = 1482,7

Ejemplo 16 MC-vc-bisPAB-dimetilpipBOR **66**

En un vial, se incorporó 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-nitrofenil carbonato **6** (1,56 g, 2,11 mmol, 100% en masa) en DMF (55 equivalentes, 116 mmol, 55,0, 8,5 g) y se agitó a TA. A esta mezcla de color amarillo turbia se añadió (4-aminofenil)metanol (PAB, 1,1 equivalentes, 2,33 mmol, 1,10, 286 mg) y 1-hidroxibenzotriazol (0,37 equivalentes, 0,782 mmol, 0,370, 106 mg) seguido de N,N'-diisopropiletilamina (1 equivalente, 2,11 mmol, 1,00, 276 mg). La reacción se agitó durante 2 horas y se monitorizó por LC/MS. Se añadieron 1 equivalente adicional de N,N'-diisopropiletilamina (Hunigs Base) y 100 mg de (4-aminofenil)metanol. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente sellada. Se añadieron aproximadamente 0,5 l de dietil éter gota a gota para precipitar el producto. El éter se decantó, el sólido se redisolvió en DMF y se purificó directamente sobre HPLC en varios lotes para dar 4-((S)-2-((S)-2-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil 4-(hidroximetil)fenilcarbamato **28** (0,435 g) con un rendimiento global aislado del 28 % (M/Z: 722,5), que tiene la estructura:

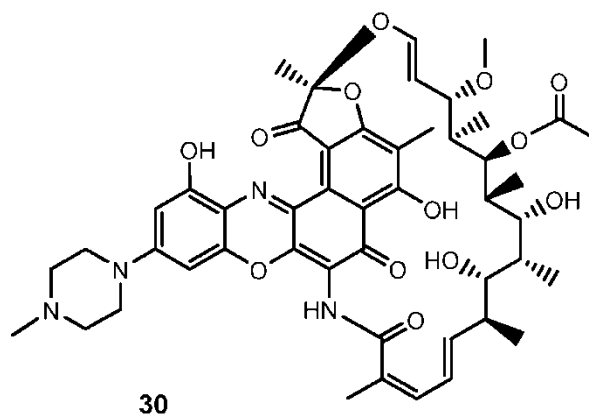


5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzil 4-(hidroximetil)fenilcarbamat **28** con cloruro de tionilo para dar 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzil 4-(clorometil)fenilcarbamat **29** con un rendimiento global aislado del 47 % (M/Z: 740,4), que tiene la estructura:



10 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)benzil 4-(clorometil)fenilcarbamat **29** con dimetilpiperidil benzoxazina rifamicina (dimetil pipBOR) **7** para dar MC-vc-bisPAB-dimetilpipBOR **66** con un rendimiento del 5 % (M/Z: 1632,1)

15 Ejemplo 17 MC-vc-PAB-metilpiperaz BOR 67



20 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4, se hizo reaccionar N-((S)-1-((S)-1-(4-(clorometil)fenilamino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)-6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamida **9** con metilpiperazino benzoxazina rifamicina (metil piperazBOR) **30** para dar MC-vc-PAB-metilpiperaz BOR **67**. M/Z = 1454,68

25 Ejemplo 18 Los MRSA intracelulares están protegidos de los antibióticos

Este ejemplo proporciona evidencia de que MRSA puede sobrevivir intracelularmente *in vivo*. En una infección, los MRSA intracelulares están protegidos de y pueden sobrevivir al tratamiento con antibióticos (tal como la a SOC con vancomicina), permitiendo la transferencia de infección de una célula a otra.

30 *Determinaciones de MIC para bacterias extracelulares:* La MIC para las bacterias extracelulares se determinó

preparando diluciones en serie de 2 veces del antibiótico en Caldo de Soja Tríplico. Las diluciones del antibiótico se hicieron por cuadruplicado en placas de cultivo de 96 pocillos. Se tomó MRSA (cepa NRS384 de USA300) de un cultivo en crecimiento exponencial y se diluyó a 1×10^4 UFC/ml. Las bacterias se cultivaron en presencia de antibióticos durante 18-24 horas con agitación a 37 °C y se determinó el crecimiento bacteriano leyendo la densidad óptica (DO) a 630 nM. Se determinó que la MIC era la dosis de antibiótico que inhibía el crecimiento bacteriano en > 90 %.

Determinaciones de MIC para bacterias intracelulares: La MIC intracelular se determinó en bacterias secuestradas dentro de macrófagos peritoneales de ratón. Los macrófagos se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/ml y se infectaron con MRSA (cepa NRS384 de USA300) en una proporción de 10-20 bacterias por macrófago. Los cultivos de macrófagos se mantuvieron en medios de crecimiento complementados con 50 µg/ml de gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares y se añadieron antibióticos de prueba a los medios de crecimiento 1 día después de la infección. La supervivencia de las bacterias intracelulares se evaluó 24 horas después de la adición de los antibióticos. Los macrófagos se lisaron con Solución Salina Tamponada de Hanks complementada con albúmina de suero bovino al 0,1 % y Triton-X al 0,1 %, y las diluciones en serie del lisado se prepararon en solución Salina Tamponada con Fosfato que contenía Tween-20 al 0,05 %. El número de bacterias intracelulares supervivientes se determinó mediante siembra en placas de Agar de Soja Tríplico con sangre de oveja desfibrinada al 5 %.

Aislamiento de macrófagos peritoneales: Los macrófagos peritoneales se aislaron del peritoneo de ratones Balb/c de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratories, Hollister, CA). Para aumentar el rendimiento de los macrófagos, los ratones se trataron previamente mediante inyección intraperitoneal con 1 ml de medio de tioglicolato (Becton Dickinson). El medio de tioglicolato se preparó a una concentración de 4 % en agua, esterilizado en autoclave y envejecido durante 20 días a 6 meses antes de su uso. Los macrófagos peritoneales se recogieron 4 días después del tratamiento con tioglicolato lavando la cavidad peritoneal con solución salina tamponada con fosfato fría. Los macrófagos se sembraron en placas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con Suero Fetal De Ternera al 10 % y HEPES 10 mM, sin antibióticos, a una densidad de 4×10^5 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos. Los macrófagos se cultivaron durante la noche para permitir la adherencia a la placa. Este ensayo también se utilizó para evaluar la destrucción intracelular en tipos de células no fagocíticas. Las líneas celulares MG63 (CRL-1427) y A549 (CCL185) se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en medios de cultivo de tejidos RPMI 1640 complementados con Hepes 10 mM y Suero Fetal De Ternera al 10 % (RPMI-10). Las células HUVEC se obtuvieron de Lonza y se mantuvieron en medio completo de células endoteliales EGM (Lonza, Walkersville, MD).

Infección de macrófagos con MRSA opsonizado: La cepa USA300 de MRSA (NRS384) se obtuvo del repositorio de NARSA (Chantilly, Virginia). Algunos experimentos utilizaron la cepa Newman de *S. aureus* (ATCC25904). En todos los experimentos, las bacterias se cultivaron en Caldo De Soja Tríplico. Para evaluar la muerte intracelular con AAC, se tomó USA300 de un cultivo de crecimiento exponencial y se lavó con HB (solución salina equilibrada de Hanks complementada con HEPES 10 mM y albúmina de suero bovino al 0,1 %). El AAC o los anticuerpos se diluyeron en HB y se incubaron con la bacteria durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo a la bacteria (opsonización), y las bacterias opsonizadas se usaron para infectar a los macrófagos en una proporción de 10-20 bacterias por macrófago (4×10^6 bacterias en 250 µl de HB por pocillo). Los macrófagos se lavaron previamente con medio DMEM sin suero inmediatamente antes de la infección, y se infectaron por incubación a 37 °C en una incubadora de cultivo de tejidos humidificada con CO₂ al 5 % para permitir la fagocitosis de la bacteria. Después de 2 horas, la mezcla de infección se eliminó y se reemplazó con medio de crecimiento normal (DMEM complementado con Suero Fetal De Ternera al 10 %, HEPES 10 mM y se añadió gentamicina a 50 µg/ml para prevenir el crecimiento de bacterias extracelulares. Al final del periodo de incubación, los macrófagos se lavaron con medios sin suero y las células se lisaron en HB complementado con triton-X al 0,1 % (lisa los macrófagos sin dañar las bacterias intracelulares). En algunos experimentos, se evaluó la viabilidad de los macrófagos al final del periodo de cultivo mediante la detección de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) citoplásmica en el sobrenadante del cultivo utilizando un kit de detección de citotoxicidad LDH (Producto 11644793001, Roche Diagnostics Corp, Indianápolis, IN). Los sobrenadantes se recogieron y analizaron inmediatamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las diluciones en serie del lisado se realizaron en solución salina tamponada con fosfato complementada con Tween-20 al 0,05 % (para romper los agregados de bacterias) y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes por siembra en placas en Agar Tríplico de Soja con sangre de oveja desfibrinada al 5 %.

Generación de células peritoneales infectadas con MRSA. Se infectaron ratones A/J hembra de 6-8 semanas de edad (ratones JAX[™], Jackson Laboratories) con 1×10^8 UFC de la cepa NRS384 de USA300 por inyección peritoneal. El lavado peritoneal se cosechó 1 día después de la infección y las células peritoneales infectadas se trataron con 50 µg/ml de lisostafina diluida en tampón Hepes complementado con BSA al 0,1 % (tampón HB) durante 30 minutos a 37 °C. Las células peritoneales se lavaron después 2X en tampón HB enfriado con hielo. Las células peritoneales se diluyeron a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 complementado con Hepes 10 mM y Suero Fetal De Ternera al 10%, y 5 µg/ml de vancomicina. Se almacenó MRSA libre de la infección primaria durante la noche a 4 °C en Solución Salina Tamponada con Fosfato como control para bacterias extracelulares que no estaban sujetas a la destrucción por los neutrófilos.

Transferencia de infección de células peritoneales a osteoblastos: La línea celular de osteoblastos MG63 se obtuvo de ATCC (CRL-1427) y se mantuvo en medio de cultivo de tejidos RPMI 1640 complementado con Hepes 10 mM y Suero Fetal De Ternera al 10% (RPMI-10). Los osteoblastos se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se cultivaron para obtener una capa confluyente. El día del experimento, los osteoblastos se lavaron una vez en RPMI (sin complementos). Se diluyeron MRSA o células peritoneales infectadas en RPMI-10 completo y se añadió vancomicina a 5 µg/ml inmediatamente antes de la infección. Se añadieron células peritoneales a los osteoblastos a 1×10^6 células peritoneales/ml. Se lisó una muestra de las células con 0,1 % de triton-x para determinar la concentración real de bacterias intracelulares vivas en el momento de la infección. El título real para todas las infecciones se determinó sembrando en placas diluciones en serie de la bacteria en Agar de Soja Tríplico con sangre de oveja desfibrinada al 5 %.

Los osteoblastos MG63 se sembraron en placas en portaobjetos de cámara de vidrio de 4 pocillos y se cultivaron en medios de cultivo de tejidos RPMI 1640 complementados con Hepes 10 mM y Suero Fetal De Ternera al 10 % (RPMI-10) hasta que formaron capas confluentes. En el día de la infección, los pocillos se lavaron con medio sin suero y se infectaron con una suspensión de células peritoneales infectadas, o con la cepa USA300 de MRSA diluida en RPMI-10 completo complementado con 5 µg/ml de vancomicina. Un día después de la infección, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en PBS con paraformaldehído al 2 %. Los pocillos se lavaron 3X en PBS y se permeabilizaron con PBS con saponina al 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Inmunofluorescencia: MRSA se identificó mediante tinción con 20 µg/ml de antiestafilococo 20920 de conejo, (abcam, Cambridge, MA) seguido de anti-rodamina de conejo (Jackson ImmunoResearch, 711-026-152). Las membranas celulares de las células peritoneales se tiñeron con subunidad de biotina de la toxina beta del cólera (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido de estreptavidina Cy5 (BD Biosciences San José, CA). La unión de la toxina del cólera a las células peritoneales se confirmó mediante tinción conjunta con el clon M1/70 de Alexa 488 anti-CD 11b (BD biosciences). Los portaobjetos se montaron con Prolong Gold con DAPI (Invitrogen, Carlsbad CA). Los portaobjetos se vieron usando un microscopio confocal Leica SPE. Las imágenes se recopilaron como una serie de pilas Z y se compilaron para generar las imágenes de proyección máximas mostradas.

La supervivencia de *S. aureus* dentro de las células de mamíferos proporciona un nicho viable que permite la infección persistente en presencia terapia con antibióticos. *S. aureus* es capaz de infectar y sobrevivir dentro de diversos tipos de células de mamíferos, incluidos los neutrófilos, macrófagos, osteoblastos y células epiteliales (Garzoni, C. y WL Kelley (2009) Trends Microbiol 17(2): 59-65). Para probar directamente si el MRSA intracelular está protegido de los antibióticos, se comparó una serie de antibióticos clínicamente aprobados por su capacidad para destruir MRSA extracelular cultivado en medios de crecimiento bacteriano convencionales, con su capacidad de destruir MRSA intracelular que está secuestrado dentro de los macrófagos murinos (Tabla 1). Los macrófagos peritoneales murinos se seleccionaron para este análisis porque estas células representan un tipo de célula primaria genéticamente normal que es un componente natural de la respuesta inmunitaria innata a *S. aureus*. El análisis confirmó que estas células se infectan y cultivan fácilmente *in vitro*. MRSA es capaz de sobrevivir intracelularmente hasta seis días después de la infección de los macrófagos (Kubica, M., K. Guzik, et al. (2008) PLoS One 3(1): e1409). Para probar el efecto intracelular de los antibióticos, los macrófagos se infectaron con MRSA y se cultivaron en presencia de gentamicina, un antibiótico que se sabe que está inactivo dentro del fagolisosoma debido a la mala captación celular del antibiótico (Vaudaux, P. y FA Waldvogel (1979) Antimicrob Agents Chemother 16(6): 743-749). Se añadieron antibióticos de prueba a los medios de cultivo (además de gentamicina) un día después de la infección en un intervalo de dosis elegidas para incluir los niveles séricos clínicamente alcanzables (mostrados como Cmax sérica en la Tabla 1). Este análisis reveló que aunque el MRSA extracelular es altamente susceptible a la inhibición del crecimiento por dosis bajas de vancomicina, daptomicina, linezolid o rifampicina en cultivo líquido, ninguno de los cuatro antibióticos logró destruir la misma cepa de MRSA intracelular que estaba secuestrada dentro de los macrófagos. De manera destacable, incluso rifampicina, que, según se informa, es uno de los mejores antibióticos para el tratamiento de infecciones intracelulares, tales como la tuberculosis, produjo una destrucción mínima de MRSA intracelular a lo largo del tiempo y en el intervalo de dosis del experimento.

Tabla 1 Concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de varios antibióticos

Antibióticos (Abx)	MIC de MRSA extracelular (µg/ml)	MIC de MRSA intracelular (µg/ml)	Cmax sérica (µg/ml)
Vancomicina	1	>100	10-40
Daptomicina	4	>100	80
Linezolid	0,3	>20	10
Rifampicina	0,004	>20	20

Los datos anteriores confirmaron que las bacterias intracelulares están protegidas de los antibióticos durante el tiempo que están secuestradas dentro de las células. Sin embargo, no se cree que MRSA sea un verdadero patógeno intracelular ya que no es capaz de infectar células vecinas por transferencia directa de célula a célula, y la

mayoría de las células infectadas eventualmente lisarán y liberarán las bacterias intracelulares. Por lo tanto, seguía siendo posible que el grupo intracelular, una vez liberado, inevitablemente estuviera expuesto a antibióticos extracelulares al menos de forma transitoria, incluso si las bacterias fueron captadas inmediatamente por las células vecinas. La absorción de MRSA libre por los macrófagos requiere entre 15 y 90 minutos (datos no mostrados), lo que sugiere que si las bacterias fueron capaces resistir una breve exposición al antibiótico, podrían permanecer protegidas en el nicho intracelular moviéndose secuencialmente de una célula moribunda a una nueva hospedadora. Para determinar si una breve exposición a antibióticos era suficiente para destruir MRSA, se evaluaron la vancomicina, el tratamiento de referencia actual para las infecciones por MRSA, y la rifampicina. Se tomó MRSA de un cultivo en crecimiento activo y se diluyó a 1×10^6 bacterias/ml en medios de crecimiento normales. Se añadieron antibióticos a dos dosis que representan entre 2x y 10x la concentración inhibitoria mínima esperada (MIC). Las muestras se eliminaron en diversos momentos entre 30 minutos y 5 horas, y el antibiótico se eliminó por centrifugación y dilución. El número total de bacterias supervivientes en el cultivo se determinó mediante la siembra placas sobre placas de agar.

La Figura 1 muestra la comparación del tiempo de destrucción por vancomicina (vanco) y rifampicina (Rifa) en la división activa de MRSA. MRSA se cultivó durante 5 horas en medio TSB en presencia de antibióticos. En los momentos indicados, se tomó una muestra del cultivo y el antibiótico se eliminó por centrifugación. El número total de bacterias supervivientes se determinó en cada punto temporal mediante siembra en placas. La vancomicina se probó a 2 $\mu\text{g/ml}$ (cuadrado abierto) y 20 $\mu\text{g/ml}$ (cuadrado cerrado). La rifampicina se probó a 0,02 $\mu\text{g/ml}$ (triángulo abierto) y 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (triángulo cerrado). Estos datos (Figura 1) revelaron que, aunque ambos antibióticos fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de manera eficaz, y en 5 horas se observó una pérdida de 100 veces en bacterias viables, las bacterias se destruyeron gradualmente durante el período de observación de 5 horas y el 90 % de las bacterias permanecieron viables durante las primeras dos horas de tratamiento con antibióticos, lo que permitió un amplio tiempo para la posible captación por parte de las células hospedadoras.

Las reservas intracelulares de MRSA se analizaron para determinar la transferencia de infección a un nicho intracelular permisivo en presencia de vancomicina. *S. aureus* puede sobrevivir dentro de los osteoblastos y se han observado reservas intracelulares de *S. aureus* en pacientes con osteomielitis, una afección en la que se sabe que la infección crónica por *S. aureus* es recalcitrante al tratamiento con antibióticos (Thwaites y Gant, (2011) Nature Reviews Microbiology 9: 215-222; Ellington et al., (2006) J. Orthopedic Research 24(1): 87-93; Bosse et al., (2005) J. Bone and Joint Surgery, 87(6): 1343-1347). Se desarrolló un ensayo *in vitro* utilizando una línea celular de osteoblastos MG63 ya que se informó que esta línea celular es capaz de albergar *S. aureus* intracelular (Garzoni y Kelly, (2008) Trends in Microbiology). Este ensayo confirmó que MRSA es capaz de infectar células MG63 y que las bacterias intracelulares viables pueden recuperarse de las células MG63 infectadas hasta durante 6 días *in vitro*. Para generar un grupo de *S. aureus* intracelular, se recogieron células peritoneales de ratones que fueron infectados por inyección peritoneal de MRSA (Figura 2).

La Figura 2 muestra la transferencia de infección de células peritoneales infectadas a osteoblastos en presencia de vancomicina. Para generar un grupo de *S. aureus* intracelular, los ratones A/J se infectaron con MRSA y las células peritoneales infectadas se tomaron 1 día después de la infección. De manera similar, se ha informado que las células generadas albergan bacterias intracelulares viables que son capaces de transferir infecciones en un modelo de infección *in vivo* (Gresham et al. J Immunol 2000; 164:3713-3722). Las células peritoneales infectadas consistían en una mezcla de principalmente neutrófilos y macrófagos y aproximadamente el 10 % de las células albergaban bacterias intracelulares. Las células se trataron con lisostafina para eliminar las bacterias extracelulares y se suspendieron en medios de crecimiento complementados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina. Una muestra de las células peritoneales utilizadas para la infección se lisó para determinar la dosis precisa de MRSA intracelular viable en el momento en que se inició la infección y también se diluyeron diferentes dosis de MRSA extracelular libre en medios con vancomicina para la comparación. Las células peritoneales (MRSA intracelular) o las bacterias libres (MRSA extracelular) se añadieron después a monocapas de osteoblastos MG63 y se cultivaron durante 4 horas (barras abiertas) o 1 día (barras cerradas). El número total de bacterias intracelulares supervivientes en cada pocillo se determinó sembrando en placas lisados celulares sobre placas de agar. Los MRSA intracelulares estaban protegidos de la vancomicina en comparación con los controles extracelulares de MRSA. Los pocillos infectados con 3×10^4 bacterias intracelulares produjeron 8.750 bacterias intracelulares (aproximadamente 1 tercio de la dosis de infección) 1 día después de la infección, mientras que las bacterias extracelulares se destruyeron de manera eficaz como infección con una dosis similar de MRSA libre que produjo solo 375 bacterias intracelulares 1 día después de la infección.

La microscopía de inmunofluorescencia también demostró la transferencia de infección de las células peritoneales a los osteoblastos MG63. Se recogieron células peritoneales de ratones 1 día después de la infección con MRSA y se trataron con lisostafina para destruir cualquier bacteria extracelular contaminante (infección intracelular). El MRSA libre se tomó de un cultivo en crecimiento activo y se lavó con PBS (infección extracelular). El número total de bacterias viables en las muestras de infección intracelular y extracelular se confirmó mediante siembra en placas sobre placas de agar y ambas muestras se suspendieron en medios complementados con 5 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina inmediatamente antes de la adición a capas confluentes de osteoblastos MG63 cultivados en portaobjetos de cámara. Un día después de la infección, las células MG63 se lavaron para eliminar las bacterias extracelulares, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo anti-*S. aureus* para identificar MRSA intracelular y toxina del cólera que

se unió preferentemente a las membranas de las células peritoneales. Todos los núcleos celulares se tiñeron conjuntamente con DAPI para confirmar que la monocapa MG63 estaba intacta. Los portaobjetos se examinaron por microscopía confocal.

- 5 Los pocillos infectados con células peritoneales contenían una monocapa confluyente de células MG63 y los macrófagos peritoneales eran claramente visibles en la parte superior de la capa MG63. Muchos de los macrófagos estaban claramente infectados con MRSA, que es visible como grupos de bacterias rojas en la imagen de un solo color o partículas blancas en la imagen superpuesta. Además de los macrófagos infectados, se observaron ejemplos claros de bacterias que estaban asociadas solamente con las células MG63. Estas células MG63 infectadas también
10 eran visibles en pocillos que estaban infectados con el MRSA libre. La infección con MRSA libre requirió un inóculo mucho más alto para lograr un nivel similar de infección en las células MG63.

Los resultados anteriores establecieron que tanto el MRSA libre como el MRSA intracelular pueden sobrevivir e infectar células MG63 en presencia de vancomicina. Las bacterias de la infección intracelular fueron
15 significativamente más capaces de sobrevivir al tratamiento con vancomicina que las bacterias libres en estas condiciones. La infección con 3×10^4 UFC de bacterias intracelulares produjo $8,7 \times 10^3$ UFC de bacterias intracelulares 1 día después de la infección. La infección con una dosis similar de bacterias libres produjo solamente 375 bacterias intracelulares 1 día después de la infección, indicando que las bacterias intracelulares fueron hasta 20 veces más capaces de sobrevivir que las bacterias libres. Todas las dosis de infección recuperaron más bacterias intracelulares
20 (entre 1,5 y 6 veces) cuando los pocillos se recogieron 1 día frente a 4 horas después de la infección. Debido a que la vancomicina inhibe completamente el crecimiento cuando se añade al MRSA libre (Figura 1), estos datos sugieren que el MRSA debe haberse replicado en algún momento a pesar de la exposición constante a vancomicina en los medios de cultivo. Aunque MRSA no se replica significativamente dentro de los macrófagos murinos (nuestras observaciones no publicadas), hay evidencia considerable de que *S. aureus* es capaz de escapar del fagolisosoma y replicarse dentro del citoplasma de los tipos de células no fagocíticas (Jarry, T. M., G. Memmi, et al. (2008) Cell
25 Microbiol 10(9): 1801-1814). En conjunto, las observaciones anteriores sugieren que incluso en exposición constante a la vancomicina, MRSA libre puede infectar células y MRSA intracelular puede transferirse de una célula a otra. Estas observaciones revelan un posible mecanismo para el mantenimiento e incluso la propagación de la infección que podría producirse en presencia de una terapia antibiótica constante.

30 Ejemplo 19 Modelos de infección *in vivo*.

Modelo de peritonitis. Se infectaron ratones A/J hembra de 7 semanas (Jackson Laboratories) mediante inyección peritoneal con 5×10^7 UFC de USA300. Los ratones se sacrificaron 2 días después de la infección y el peritoneo se
35 lavó abundantemente con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato fría (PBS). Los riñones se homogeneizaron en 5 ml de PBS como se describe a continuación para el modelo de infección intravenosa. Los lavados peritoneales se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm a 4 °C en una centrífuga de sobremesa. El sobrenadante se recogió como la bacteria extracelular y el sedimento celular que contenía células peritoneales se recogió como la fracción intracelular. Las células fueron tratadas con 50 µg/ml de lisostafina durante 20 minutos a 37 °C para destruir las
40 bacterias extracelulares contaminantes. Las células peritoneales se lavaron 3X en PBS enfriado con hielo para eliminar la lisostafina antes del análisis. Para contar el número de UFC intracelulares, las células peritoneales se lisaron en HB (solución salina equilibrada de Hanks complementada con HEPES 10 mM y Albúmina De Suero Bovino al 0,1%) con Triton-X al 0,1% y se hicieron diluciones en serie del lisado en PBS con tween-20 al 0,05%.

45 *Modelo de infección intravenosa:* Se utilizaron ratones hembra de 7 semanas de edad para todos los experimentos *in vivo* y se llevaron a cabo infecciones por inyección intravenosa en la vena de la cola. Los ratones A/J (Jackson Lab) se infectaron con una dosis de 2×10^5 UFC. Los ratones Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) se infectaron con una dosis de 2×10^7 UFC. Para los estudios que examinan el papel de la competencia de IgG humana (modelo IVIG en SCID), se reconstituyeron ratones CB17.SCID (Charles River Laboratories, Hollister, CA) con inmunoglobulina GammaGard S/D IGIV (ASD Healthcare, Brooks KY) utilizando una pauta posológica optimizada para alcanzar niveles séricos constantes de > 10 mg/ml de IgG humana. Se administró IGIV con una dosis
50 intravenosa inicial de 30 mg por ratón seguida de una segunda dosis de 15 mg/ratón por inyección intraperitoneal después de 6 horas, y las dosis diarias posteriores de 15 mg por ratón por inyección intraperitoneal durante 3 días consecutivos. Los ratones se infectaron 4 horas después de la primera dosis de IGIV con 2×10^7 UFC de MRSA diluido en solución salina tamponada con fosfato mediante inyección intravenosa. Los ratones que recibieron vancomicina se trataron con inyecciones intraperitoneales dos veces al día de 100 mg/kg de vancomicina que comenzaron entre 6 y 24 horas después de la infección durante la duración del estudio. Los agentes terapéuticos experimentales (AAC, anticuerpos anti-MRSA o antibiótico dimetil-pipBOR libre) se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato y se administraron con una inyección intravenosa única de 30 minutos a 24 horas después
60 de la infección. Todos los ratones se sacrificaron el día 4 después de la infección, y los riñones se recogieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato. Las muestras de tejido se homogeneizaron usando un GentleMACS Dissociator™ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). El número total de bacterias recuperadas por ratón (2 riñones) se determinó sembrando en placas diluciones en serie del homogeneizado de tejido en PBS, Tween al 0,05 % sobre Agar Triptico DE Soja con sangre de oveja desfibrinada al 5 %.

65 Ejemplo 20 Ensayo de liberación de Catepsina/Caspasa

Para cuantificar la cantidad de antibiótico activo liberado de AAC después del tratamiento con catepsina B, los AAC se diluyeron a 200 µg/ml en tampón de catepsina (acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, L-cisteína 5 mM). Véase: página 863 de Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13:855-869. Se añadió catepsina B (de bazo bovino, SIGMA C7800) a 10 µg/ml y las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Como control, se incubaron AAC en tampón solo. La reacción se detuvo mediante la adición de 10 volúmenes de medios de crecimiento bacteriano, Caldo De Soja Tríptico a pH 7,4 (TSB). Para estimar la liberación total de antibiótico activo, se hicieron diluciones en serie de la mezcla de reacción por cuadruplicado en TSB en placas de 96 pocillos y se añadió la cepa USA300 de *S. aureus* a cada pocillo a una densidad final de 2×10^3 UFC/ml. Los cultivos se incubaron durante la noche a 3 °C con agitación y se midió el crecimiento bacteriano leyendo la absorbancia a 630 nM usando un lector de placas.

Ejemplo 21 Producción de anticuerpos anti-WTA

Generación de anticuerpos, exploración y selección

Abreviaturas: MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina); MSSA (*S. aureus* sensible a meticilina); VISA (*S. aureus* resistente a productos intermedios de vancomicina); LTA (ácido lipoteicoico); TSB (caldo de soja tríptico); CWP (preparación de pared celular).

Los anticuerpos IgG humanos se clonaron a partir de linfocitos B periféricos de pacientes posteriormente a la infección por *S. aureus* utilizando la tecnología Symplex™ (Symphogen, Lyngby, Dinamarca) que conserva el emparejamiento afín de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, como se describe en el documento US 8.283.294: "Method for cloning cognate antibodies"; Meijer PJ et al. Journal of Molecular Biology 358:764-772 (2006); y Lantto J et al. J Virol. 85(4):1820-33 (febrero de 2011); Se usaron células plasmáticas y de memoria como fuente genética para los repertorios de IgG recombinantes de longitud completa. Los clones de anticuerpos individuales se expresaron mediante transfección de células de mamífero como se describe en Meijer PJ, et al. Methods in Molecular Biology 525: 261-277, xiv. (2009). Los sobrenadantes que contenían anticuerpos IgG1 de longitud completa se recogieron después de siete días y se usaron para explorar la unión al antígeno mediante ELISA indirecto en la exploración primaria. Se generó una biblioteca de AcM que muestran una unión ELISA positiva a las preparaciones de la pared celular de las cepas de *S. aureus* cepa USA300 o Wood46. Posteriormente se produjeron anticuerpos en transfecciones transitorias de 200 ml y se purificaron con cromatografía con proteína A (MabSelect SuRe, GE Life Sciences, Piscataway, NJ) para pruebas adicionales. Para la producción de anticuerpos a mayor escala, se produjeron anticuerpos en células CHO. Los vectores que codifican VL y VH se transfectaron en células CHO y la IgG se purificó a partir de medios de cultivo celular mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

Tabla 7: Lista de antígenos utilizados para aislar los Ac

Ag	Descripción	Vendedor/fuente	Recubrimiento
WTA	Ácido teicoico de pared (WTA) de estafilococo A. N.º de Cat. R84500 (2 mg/vial), N.º de lote 5E14909.	Meridian Life Sciences	2 µg/ml
PGN	Peptidoglicano de <i>Staphylococcus aureus</i> ; N.º de Cat. 77140, N.º de lote 1396845	Sigma	2 µg/ml
CW n.º 1	CW de USA300, RPMI, agotamiento de hierro. Fase estacionaria	Genentech, 100x	
CW n.º 3	CW de USA300, TSB. Fase estacionaria	Genentech, 500X	
CW n.º 4	CW de Wood46, TSB. Fase estacionaria	Genentech, 500X	
Siempre se mezclaron CW n.º 1 y CW n.º 3 para hacer el recubrimiento ELISA:			

La Figura 6 resume la exploración primaria de los anticuerpos mediante ELISA. Todos (excepto 4569) se aislaron cuando se exploraron con la mezcla de preparación de la pared celular (CWP por sus siglas en inglés) de USA300 (agotamiento de hierro:TSB en una relación de 96:4). Todos los Ac de GlcNAc beta (excepto 6259), SDR y PGN (4479) también fueron positivos para PGN y WTA en la exploración primaria. Todos los GlcNAc alfa se encontraron exclusivamente mediante exploración para la unión con la mezcla de CW de USA300. El 4569 (específico de LTA) se encontró mediante exploración en CWP de Wood46.

Selección de AcM anti-WTA de la biblioteca usando citometría de flujo ex vivo

Se consultó cada AcM dentro de esta biblioteca por tres criterios de selección: (1) intensidad relativa de unión de AcM a la superficie de MRSA, como una indicación de alta expresión del antígeno afín correspondiente que favorecería un alto suministro de antibióticos; (2) consistencia de la unión de AcM a MRSA aislado de una variedad diversa de tejidos infectados, como una indicación de la expresión estable del antígeno afín en la superficie de MRSA *in vivo* durante las infecciones; y (3) capacidad de unión de AcM a un panel de cepas clínicas de *S. aureus*,

como una indicación de conservación de la expresión del antígeno de superficie afín. Con este fin, se usó citometría de flujo para probar todos estos sobrenadantes de cultivo de AcM preseleccionados en la biblioteca para determinar la reactividad con *S. aureus* de varios tejidos infectados y de diferentes cepas *S. aureus*.

- 5 Todos los AcM en la biblioteca se analizaron para determinar su capacidad para unirse a MRSA de riñones, bazo, hígados y pulmones infectados de ratones infectados con MRSA USA300; y dentro de corazones o riñones de conejos que se infectaron con USA300 COL en un modelo de endocarditis de conejo. La capacidad de un anticuerpo para reconocer *S. aureus* de varios tejidos infectados aumenta la probabilidad de que el anticuerpo terapéutico sea activo en una amplia variedad de infecciones clínicas diferentes con *S. aureus*. Las bacterias se analizaron inmediatamente después de la recogida de los órganos, es decir, sin subcultivo, para prevenir cambios fenotípicos causados por condiciones de cultivo *in vitro*. Los presentes inventores habían observado previamente que varios antígenos de superficie de *S. aureus*, aunque se expresaban durante el cultivo *in vitro*, perdían su expresión en tejidos infectados. Es poco probable que los anticuerpos dirigidos contra tales antígenos sean útiles para tratar infecciones. Durante el análisis de esta biblioteca de AcM en varios tejidos infectados, esta observación se confirmó para un número significativo de anticuerpos, que mostró una unión significativa a bacterias *S. aureus* de cultivo, pero ausencia de unión a bacterias de todos los tejidos infectados probados. Algunos anticuerpos se unen a las bacterias de algunos tejidos infectados, pero no todos. Por lo tanto, en la presente invención, los presentes inventores seleccionaron los anticuerpos que pudieron reconocer las bacterias de todas las condiciones de infección probadas. Los parámetros que se evaluaron fueron (1) intensidad de fluorescencia relativa, como medida para la abundancia de antígeno; (2) número de órganos que se tiñeron positivamente, como medida para la estabilidad de la expresión de antígeno; y (3) capacidad de unión de AcM a un panel de cepas clínicas de *S. aureus* como una indicación de conservación de la expresión del antígeno de superficie afín. La intensidad de fluorescencia de los anticuerpos de prueba se determinó con respecto a un anticuerpo de control de isotipo dirigido contra un antígeno no relevante, por ejemplo, AcM IgG1 anti-gD:5237 de herpes virus (referenciado a continuación). Los AcM contra WTA-beta no solo mostraron la mayor abundancia de antígeno, sino que también mostraron una unión muy consistente a MRSA de todos los tejidos infectados probados y especificados anteriormente.

- Adicionalmente, se probó la capacidad de estos AcM para unirse a las siguientes cepas de *S. aureus*, que se cultivaron *in vitro* en TSB: USA300 (MRSA), USA400 (MRSA), COL (MRSA), MRSA252 (MRSA), Wood46 (MSSA), Rosenbach (MSSA), Newman (MSSA) y Mu50 (VISA). Se descubrió que los AcM anti-WTA beta pero no los AcM anti-WTA alfa son reactivos con todas estas cepas. El análisis de la unión a diferentes cepas indicó que WTA beta está más conservado que WTA alfa y, por lo tanto, es más adecuado para AAC.

- Ejemplo 22 Caracterización de anticuerpos con especificidad contra los ácidos teicoicos de pared en *S. aureus*.

35 i) Confirmación de la especificidad de Ac a WTA

- Se generaron preparaciones de pared celular (CWP) de una cepa de *S. aureus* de tipo silvestre (WT) y una cepa *S. aureus* mutante que carece de WTA (Δ TagO; cepa nula para WTA) incubando 40 mg de cepas de *S. aureus* sedimentadas con 1 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) complementado con rafinosa al 30 %, 100 μ g/ml de lisostafina (Cell Sciences, Canton, MA) y cóctel inhibidor de proteasas sin EDTA (Roche, Pleasanton, CA), durante 30 min a 37 °C. Los lisados se centrifugaron a 11.600 x g durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes que contenían componentes de la pared celular. Para el análisis por inmunotransferencia, las proteínas se separaron en un gel de Tris-glicina al 4-12 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de la transferencia con anticuerpos de prueba indicados contra WTA o con anticuerpos de control contra PGN y LTA.

- La inmunotransferencia muestra que los anticuerpos contra WTA se unen a las preparaciones de la pared celular de *S. aureus* de tipo silvestre pero no a las preparaciones de la pared celular de la cepa Δ TagO que carece de WTA. Los anticuerpos de control contra peptidoglicano (anti-PGN) y ácido lipoteicoico (anti-LTA) se unen bien a ambas preparaciones de la pared celular. Estos datos indican la especificidad de los anticuerpos de prueba contra WTA.

50 ii) Citometría de flujo para determinar el grado de unión de AcM a la superficie de MRSA

- La expresión del antígeno de superficie en bacterias enteras de tejidos infectados se analizó mediante citometría de flujo usando el siguiente protocolo. Para la tinción de anticuerpos de bacterias de tejidos de ratones infectados, se infectaron ratones hembra C57B1/6 de 6-8 semanas de edad (Charles River, Wilmington, MA) por vía intravenosa con 10^8 UFC de USA300 cultivada en fase logarítmica en PBS. Los órganos de los ratones se recogieron dos días después de la infección. La endocarditis infecciosa de conejo (IE, por sus siglas en inglés) se estableció como se describe anteriormente en Tattevin P. et al. Antimicrobial agents and chemotherapy 54: 610-613 (2010). Los conejos se inyectaron por vía intravenosa con 5×10^7 UFC de la cepa COL de MRSA cultivada en fase estacionaria y se recogieron las vegetaciones del corazón dieciocho horas más tarde. El tratamiento con 30 mg/kg de vancomicina se administró por vía intravenosa dos veces al día, 18 h después de la infección con 7×10^7 UFC en fase estacionaria.

- Para lisar células de ratón o conejo, los tejidos se homogeneizaron en tubos M (Miltenyi, Auburn, CA) usando un disociador de células gentleMACS (Miltenyi), seguido de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en PBS que contiene Triton-X100 (Thermo) al 0,1 %, 10 μ g/ml de DNAsal (Roche) y cóctel de inhibidor de proteasas.

Complete Mini (Roche). Las suspensiones se pasaron a través de un filtro de 40 micras (BD) y se lavaron con HBSS sin rojo fenol complementado con BSA sin IgG al 0,1 % (Sigma) y Hepes 10 mM, pH 7,4 (tampón HB). Las suspensiones bacterianas se incubaron después con 300 µg/ml de IgG de conejo (Sigma) en tampón HB durante 1 ha temperatura ambiente (RT) para bloquear la unión inespecífica de IgG. Las bacterias se tiñeron con 2 µg/ml de anticuerpos primarios, incluyendo rF1 o AcM anti-gD:5237 de herpes virus con IgG1 de control de isotipo (Nakamura GR et al., J Virol 67: 6179-6191 (1993)) y a continuación, con anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Para permitir la diferenciación de bacterias de residuos de órganos de ratones o conejos, se realizó una doble tinción usando 20 µg/ml de AcM 702 de ratón anti-peptidoglicano de *S. aureus* (Abcam, Cambridge, MA) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con fluorocromo (Jackson ImmunoResearch). Las bacterias se lavaron y analizaron por FACSCalibur (BD). Durante el análisis por citometría de flujo, las bacterias se seleccionaron para la tinción positiva con AcM 702 de gráficos de fluorescencia doble.

iii) Medición de la afinidad de unión a *S. aureus* y densidad de antígenos en MRSA

La Tabla 8 muestra el análisis de unión en equilibrio de los anticuerpos de MRSA que se unen a la cepa Newman-ΔSPA, y la densidad de antígenos en la bacteria.

Tabla 8

Anticuerpo de MRSA	Especificidad	K _D promedio, nM (n=2)	Densidad de antígenos, Sitios promedio/ Bacteria
4497	b-WTA	2,5	50.000
4462	b-WTA	3,1	43.000
6263	b-WTA	1,4	22.000
6297	b-WTA	1,1	21.000
7578	a-WTA	0,4	16.000
rF1	SDR-glico	0,3	1600

La K_D y la densidad de antígenos se obtuvieron usando un ensayo de unión a células con radioligando en las siguientes condiciones de ensayo: DMEM + tampón de unión a suero de ratón al 2,5 %; unión de la solución durante 2 horas a temperatura ambiente (RT); y usando 400.000 bacterias/pocillo.

El Ac 6263 es similar a 6078 en que las secuencias son muy similares. Excepto por el segundo resto (R frente a G) en CDR H3, todas las otras secuencias CDR de cadena L y H son idénticas.

Ejemplo 23 Modificación por ingeniería de mutantes de anticuerpos de WTA

En síntesis, la región VH de cada uno de los Ac anti-WTA beta se clonó y se enlazó a la región constante gamma1 de la cadena H humana y la VL se enlazó a la región constante kappa para expresar los Ac como IgG1. En algunos casos, las secuencias de tipo silvestre se alteraron en determinadas posiciones para mejorar la estabilidad de los anticuerpos como se describe a continuación. Después se generaron Ac modificados por ingeniería con cisteína (TioMab).

i. Enlace de regiones variables a regiones constantes

Las regiones VH de los Ac de WTA beta identificadas a partir de la biblioteca de anticuerpos humanos anterior se enlazaron a las regiones constantes γ1 humanas para preparar Ac IgG1 de longitud completa. Las cadenas L eran cadenas L kappa.

ii. Generación de variantes de estabilidad

Los Ac de WTA en la Figura 14, (véanse en particular, las figuras 15A, 15B, 16A, 16B) se modificaron por ingeniería para mejorar determinadas propiedades (tales como evitar la desamidación, la isomerización del ácido aspártico, la oxidación o la glicosilación ligada a N) y se probaron para determinar la retención de la unión al antígeno, así como la estabilidad química después de los reemplazos de aminoácidos. El ADN monocatenario de los clones que codifican las cadenas pesadas o ligeras se purificó a partir de partículas de fago M13KO7 cultivadas en células CJ236 de *E. coli* usando un kit QIAprep Spin M13 (Qiagen). Se usaron oligonucleótidos sintéticos 5' fosforilados con las secuencias:

5'-CCCAGACTGCACCAGCTGGATCTCTGAATGTACTCCAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 152)

5'-CCAGACTGCACCAGCTGCACCTCTGAATGTACTCCAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 153)

5'CCAGGGTTCCTGGCCCCAWTMGTCAAGTCCASCWKACCTCTTGACAGTAATAGACAGC-3' (SEQ ID NO: 154);

5 y

5'-CCTGGCCCCAGTCGTCAAGTCCTCCTTCACCTCTTGACAGTAATAGACAGC-3' (SEQ ID NO: 155) (códigos IUPAC)

- 10 para mutar los clones que codifican los anticuerpos mediante mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos como se describe mediante mutagénesis específica de sitio siguiendo la metodología descrita en Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82(2): 488-492. Se usó ADN mutagenizado para transformar células XL1-Blue de *E. coli* (Agilent Technologies) y se sembraron en placas sobre placas de Caldo Luria que contenían 50 µg/ml de Carbenicilina. Las colonias se recogieron individualmente y se cultivaron en medio líquido de Caldo Luria que contenía 50 µg/ml de Carbenicilina. Se secuenció el ADN Miniprep para confirmar la presencia de mutaciones.

20 Para el Ac 6078, el segundo aminoácido en la VH, met (met-2), es propenso a la oxidación. Por lo tanto, met-2 se mutó a Ile o Val, para evitar la oxidación del resto. Debido a que la alteración de met-2 puede afectar la afinidad de unión, se probaron los mutantes para determinar la unión a CWP de estafilococos por ELISA.

25 Se descubrió que los motivos "DG" o "DD" de la CDR H3 eran propensos a transformarse en ácido isoaspártico. El Ac 4497 contiene DG en las posiciones 96 y 97 de CDR H3 (véase la Figura 18B) y se alteró por estabilidad. CDR H3 es generalmente crítico para la unión al antígeno, por lo que se evaluó la unión a antígeno y la estabilidad química de varios mutantes (véase la Figura 18A). El mutante D96E (v8) conserva la unión a antígeno, similar al AC 4497 de tipo silvestre (Figura 18A; Figura 18B) y es estable y no forma ácido isoaspártico.

ELISA de CWP de estafilococos

- 30 Para el análisis de mutantes del anticuerpo 6078, una preparación de pocillos de células USA300 ΔSPA de *S. aureus* (WT) tratada con lisostafina que consiste en 1×10^9 microbios/ml se diluyeron 1/100 en carbonato de sodio 0,05 pH 9,6 y se recubrieron sobre placas ELISA de 384 pocillos (Nunc; Neptune, NJ) durante una incubación durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron con PBS más Tween-20 al 0,05 % y se bloquearon durante una incubación de 2 horas con PBS más albúmina de suero bovino al 0,5 % (BSA). Esta y todas las incubaciones posteriores se realizaron a temperatura ambiente con agitación suave. Las muestras de anticuerpos se diluyeron en muestra/tampón de dilución patrón (PBS, BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,05 %, CHAPS al 0,25 %, EDTA 5 mM, NaCl 0,35 M, 15 ppm de Proclina, pH 7,4), se añadieron a las placas lavadas y se incubaron durante 1,5 - 2 horas. Se detectaron anticuerpos anti-*S. aureus* unidos a la placa durante una incubación de 1 hora con un fragmento F(ab')₂ anti- IgG (Fc) humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA) diluido a 40 ng/ml en tampón de ensayo (PBS, BSA al 0,5 %, 15 ppm de Proclina, Tween 20 al 0,05%). Después de un lavado final, se añadió tetrametilbencidina (KPL, Gaithersburg, MD), el color se desarrolló durante 5-10 minutos y la reacción se detuvo con ácido fosfórico 1 M. Las placas se leyeron a 450 nm con una referencia de 620 nm utilizando un lector de microplacas.

45 *iii. Generación de mutantes modificados por ingeniería con Cys (TioMab)*

- Los TioMab de longitud completa se produjeron mediante la introducción de una Cisteína en la cadena H (en CHI) o en la cadena L (C_K) en una posición predeterminada como se enseña anteriormente y se describe a continuación para permitir la conjugación del anticuerpo con un producto intermedio enlazador-antibiótico. Las cadenas H y L se clonan después en plásmidos separados y los plásmidos que codifican H y L se cotransfectan en células 293 donde se expresan y se ensamblan en Ac intactos. Las cadenas H y L también se pueden clonar en el mismo plásmido de expresión. Se preparan IgG1 que tienen 2 Cys modificadas por ingeniería, una en cada una de las cadenas H, o 2 Cys modificadas por ingeniería, una en cada una de las cadenas L, o se generó una combinación de cadenas 2H y 2L, cada una con Cys modificadas por ingeniería (HCLCCys) expresando la combinación deseada de cadenas mutantes cys y cadenas de tipo silvestre.

60 Las Figuras 15A y 15B muestran el 6078 WT y Ac mutantes con la combinación de HC Cys y LC Cys. También se probaron los mutantes de 6078 para determinar su capacidad para unirse a estafilococo A USA300 deficiente en proteína A del cultivo durante la noche. De los resultados del análisis FACS como se muestra en la Figura 19, los Ac mutantes se unieron a USA300 de manera similar que al anticuerpo 6078 WT (sin alterar); las alteraciones de los aminoácidos en los mutantes no perjudicaron la unión a estafilococo A. gD es un anticuerpo de control negativo no específico.

Ejemplo 24 Preparación de Conjugados Anticuerpo-Antibiótico anti-WTA

65 Los conjugados de anticuerpo anti-ácidos teicoicos de pared-antibiótico (AAC) Tabla 3 se prepararon conjugando un

anticuerpo anti-WTA con un producto intermedio enlazador-antibiótico, incluidos los de la Tabla 2. Antes de la conjugación, los anticuerpos anti-WTA se redujeron parcialmente con TCEP usando métodos convencionales de acuerdo con la metodología descrita en el documento WO 2004/010957. Los anticuerpos parcialmente reducidos se conjugaron con el producto intermedio enlazador -antibiótico utilizando métodos convencionales de acuerdo con la metodología descrita, por ejemplo, en Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 y en el documento US 2005/0238649 A1. Brevemente, los anticuerpos parcialmente reducidos se combinaron con el producto intermedio enlazador-antibiótico para permitir la conjugación del producto intermedio enlazador-antibiótico con restos de cisteína reducidos del anticuerpo. Las reacciones de conjugación se desactivaron y se purificaron los AAC. Se determinó la carga antibiótica (número promedio de restos antibióticos por anticuerpo) para cada AAC y estaba entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 para los anticuerpos anti-ácidos teicoicos de pared modificados por ingeniería con un único sitio mutante de cisteína.

Reducción/Oxidación de TioMab para Conjugación: Los anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería con cisteína de longitud completa (ThioMabs - Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dorman et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documento US 7521541; documento US 7723485; documento WO2009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52) expresados en células CHO se redujeron con un exceso de aproximadamente 20-40 veces de TCEP (hidrocloruro de tris(2-carboxietil)fosfina) o DTT (ditiotretol) en Tris 50 mM pH 7,5 con EDTA 2 mM durante 3 horas a 37 °C o durante la noche a temperatura ambiente (Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). El TioMab reducido se diluyó y se cargó en una columna HiTrap S en acetato de sodio 10 mM, pH 5 y se eluyó con PBS que contenía cloruro de sodio 0,3M. Alternativamente, el anticuerpo se acidificó mediante la adición de 1/20° volumen de ácido acético al 10 %, diluido con succinato 10 mM pH 5, cargado en la columna y después se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón succinato. La columna se eluyó con Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 2 mM.

El TioMab reducido eluido se trató con un exceso molar de 15 veces de DHAA (ácido deshidroascórbico) o sulfato de cobre acuoso 200 nM (CuSO₄). La oxidación de los enlaces disulfuro intercadena se completó en aproximadamente tres horas o más. La oxidación del aire ambiental también fue eficaz. El anticuerpo reoxidado se dializó en succinato de sodio 20 mM pH 5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM y se almacenó congelado a -20 °C.

Conjugación de TioMab con productos intermedios enlazador-antibióticos: Los tioanticuerpos (TioMab) desbloqueados, reoxidados, se hicieron reaccionar con un exceso molar de 6-8 veces del producto intermedio enlazador-antibiótico de la Tabla 2 (de un stock de DMSO a una concentración de 20 mM) en Tris 50 mM, pH 8, hasta que la reacción se completó (16-24 horas) como se determinó por análisis LC-MS de la mezcla de reacción.

Los conjugados anticuerpo-antibiótico (AAC) en bruto se aplicaron después a una columna de intercambio catiónico después de la dilución con succinato de sodio 20 mM, pH 5. La columna se lavó con al menos 10 volúmenes de columna de succinato de sodio 20 mM, pH 5, y el anticuerpo se eluyó con PBS. Los AAC se formularon en His/acetato 20 mM, pH 5, con sacarosa 240 mM usando columnas de filtración en gel. Los AAC se caracterizaron por espectroscopía UV para determinar la concentración de proteínas, SEC analítica (cromatografía de exclusión por tamaño) para análisis de agregación y LC-MS antes y después del tratamiento con lisina C endopeptidasa.

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó usando una columna Shodex KW802.5 en fosfato de potasio 0,2 M pH 6,2 con cloruro de potasio 0,25 mM e IPA al 15% a un caudal de 0,75 ml/min. El estado de agregación de AAC se determinó mediante la integración de la absorbancia de área máxima eluida a 280 nm.

El análisis LC-MS se realizó utilizando un instrumento Agilent QTOF 6520 ESI. Como ejemplo, un AAC generado utilizando esta química se trató con endoproteinasa Lys C (Promega) 1:500 p/p en Tris, pH 7,5, durante 30 min a 37 °C. Los fragmentos de escisión resultantes se cargaron en una columna 1000A, 8 um PLRP-S calentada a 80 °C y eluida con un gradiente de 30 % de B a 40 % de B en 5 minutos. Fase móvil A: H₂O con TFA al 0,05 %. Fase móvil B: acetonitrilo con TFA al 0,04 %. Caudal: 0,5 ml/min. La elución de proteínas se monitorizó mediante detección de absorbancia UV a 280 nm antes de la ionización por electropulverización y análisis de MS. Se logró, habitualmente, la resolución cromatográfica del fragmento Fc no conjugado, Fab no conjugado residual y antibiótico-Fab. Los espectros m/z obtenidos se desconvolucionaron utilizando el programa informático Mass Hunter™ (Agilent Technologies) para calcular la masa de los fragmentos de anticuerpos.

Ejemplo 25 Identificación y purificación de la estafopaina B como la proteasa responsable de la escisión

El sobrenadante de un cultivo durante la noche de Wood46 de 3 litros se concentró y se intercambió el tampón usando TFF (10 kDa) en fosfato de sodio 50 mM pH 7. La muestra se cargó en Q Sepharose FF y las proteínas se separaron cromatográficamente usando un gradiente de NaCl 0-300 mM en fosfato de sodio 50 mM pH 7. Las fracciones activas se identificaron incubando con tioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) de la Figura 27 y evaluando la escisión del enlazador en el sitio esperado mediante análisis LC-MS. Las fracciones activas se agruparon y se complementaron con sulfato de amonio a una concentración de 2M. Las proteínas se purificaron adicionalmente por cromatografía de interacción hidrofoba en Fenil Sepharose usando un gradiente de sulfato de amonio 2-0 M en TRIS 50 mM pH 7,5. De nuevo, Las fracciones activas se identificaron utilizando el compuesto instrumental. Estas fracciones se agruparon y se purificaron

adicionalmente en Mono Q en acetato de sodio 50 mM pH 5,5 usando un gradiente de sal de NaCl 0-1M. Las fracciones activas de esta etapa de cromatografía se identificaron como antes, se agruparon y se aplicaron a cromatografía de exclusión por tamaño en PBS. SDS-PAGE identificó las fracciones activas y determinó que contenían una única proteína de interés.

5 Las fracciones activas enriquecidas de la purificación con Q Sepharose se caracterizaron para identificar la clase de proteasa responsable de la actividad. Se encontró que la proteasa estaba inhibida por N-etilmaleimida, indicando que la enzima es probablemente una cisteína proteasa. Después de revisar las cisteína proteasas secretadas conocidas de *Staphylococcus aureus*, se identificó estafoína B para tener una especificidad de sustrato similar a la
10 especificidad observada en la exploración REPLi (Kalinska, M., T. Kantyka, et al. (2012). Biochimie 94(2): 318). Se adquirió estafoína B purificada (Sigma-Aldrich) y se incubó con tioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) de la Figura 27. Se encontró que la estafoína B escindía el enlazador en el mismo sitio que la proteasa activa purificada del sobrenadante de Wood46. La estafoína B y la proteasa activa purificada del sobrenadante del cultivo se incubaron con Alexa Fluor® 488 C₅ maleimida (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.) para marcar las cisteínas del sitio activo. Las muestras se procesaron en SDS-PAGE para identificar la proteasa como estafoína B. Los geles de SDS-PAGE de las fracciones activas de la purificación SEC se analizaron junto con la estafoína B purificada, con y sin Alexa Fluor 488.

20 Las fracciones activas enriquecidas para la purificación con Q sepharose también se analizaron por espectrometría de masa proteómica. Se ejecutaron en SDS-PAGE diez microgramos de fracciones activas B11, B12 y C02 y diez microgramos de fracciones activas, 1, 2, 3 y diez microgramos de una fracción inactiva. Las bandas se quitaron y se sometieron a digestiones nocturnas por tripsina. Las muestras digeridas se analizaron por LC-MS/MS y los resultados de los espectros de masas en tándem se enviaron para la búsqueda en la base de datos utilizando el
25 algoritmo de búsqueda Mascot. La estafoína B fue el mejor resultado para las cisteína proteasas presentes en las fracciones activas. La Autolisina, que también es una cisteína proteasa, también aparece como un mejor resultado, con la mayor abundancia de péptidos únicos que se producen en la fracción inactiva, el control negativo, por lo tanto, la autolisina se omitió del examen. El análisis proteómico del espectro de masas de las fracciones activas de las purificaciones con Q Sepharose muestra una gran abundancia de estafoína B. Los datos T de la reestructuración se filtraron para determinar proteínas *S. aureus* y se clasificaron por número de péptidos en la fracción activa 1.

La proteasa activa se purificó de sobrenadante de cultivo de Wood46 de *S. aureus*. Las células se cultivaron durante la noche a 37 °C en 3 litros de TSB. Las células se eliminaron por centrifugación a 10.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se recogió y se hizo pasar a través de dos filtros de 0,22 µm. A continuación, se concentró y el tampón se intercambió en fosfato de sodio 50 mM pH 7 usando TFF con una membrana de 10 kD. La muestra se concentró diez veces hasta un volumen de 300 ml. La muestra se cargó en Q Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences AB) y las proteínas se separaron cromatográficamente usando un gradiente de NaCl 0-300 mM en fosfato de sodio 50 mM pH 7. Las fracciones activas se agruparon y se complementaron con sulfato de amonio a una concentración de 2M. Las proteínas se purificaron adicionalmente por cromatografía de interacción hidrófoba en Fenil Sepharose (GE Healthcare Biosciences AB) usando un gradiente de sulfato de amonio 2-0 M en TRIS 50 mM pH 7,5. Las fracciones se agruparon y se purificaron adicionalmente en Mono Q (GE Healthcare Biosciences AB) en acetato de sodio 50 mM pH 5,5 usando un gradiente de sal de NaCl 0-1M. Las fracciones activas de esta etapa de cromatografía se identificaron como antes, se agruparon y se aplicaron a cromatografía de exclusión por tamaño (Zenix-150, Tecnologías Sepax) en PBS.

45 Para identificar fracciones que contienen la proteasa activa de interés de los presentes inventores, se transfirieron 100 µl de cada fracción a una placa de 96 pocillos donde se incubó con 25 µg de TIOFAB 4497 mal-GGAFAGGG-DNA31 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126). Se analizaron las fracciones de cada etapa de cromatografía para determinar la actividad, y se usaron 100 µl independientemente de la concentración de proteína. Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C y posteriormente se analizaron por LC-MS para identificar las fracciones donde se había producido la escisión por la proteasa del enlazador-antibiótico. Las fracciones activas agrupadas de la cromatografía Q Sepharose FF se midieron para tener una concentración de proteína total de 14 mg/ml. Se diluyeron 200 µg del conjunto a 2 mg/ml en PBS y se incubaron con y sin N-etilmaleimida (NEM, Sigma) a una concentración final de 0,1 mM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se
55 añadieron 25 µg de THIOFAB 4497 mal-GGAFAGGG-DNA31 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) a ambas muestras y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. A las 2 horas, las muestras se analizaron por LC-MS para identificar si se había producido la escisión por la proteasa del enlazador-antibiótico. Se incubaron aproximadamente 50 µl de las fracciones activas de SEC con 0,1 mM Alexa Fluor 488 C₅ maleimida (Invitrogen) durante 1 hora, independientemente de la concentración de proteínas para el marcado. Los ensayos de escisión con proteasas purificadas se realizaron incubando 5 µM del tioFAB conjugado con proteasa 50 nM en un volumen final de 100 µl. Los ensayos se realizaron en PBS pH 7,2, 4 mM L-Cys, EDTA 2,5 mM o citrato de sodio 100 mM pH 5, NaCl 100 mM, L-Cys 4 mM, EDTA 2,5 mM. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se desactivaron por dilución 1:1 con TFA al 1 %. Las muestras se ejecutaron posteriormente en LC-MS para determinar el porcentaje de escisión del enlazador. El porcentaje de escisión se determinó
65 integrando los cromatogramas A₂₈₀ de las especies escindidas e intactas. Los restos antibióticos o cromóforos añadidos en el extremo C de los enlazadores añaden una hidrofobicidad significativa, de modo que se resuelven en

el periodo inicial tioFAB con enlazadores intactos y tioFAB con enlazadores escindidos.

Para el análisis proteómico de fracciones enriquecidas, se cargaron diez microgramos de fracciones activas enriquecidas de la purificación con Q Sepahrose® (GE Healthcare Life Sciences) en un gel Bis-Tris al 4-12 % (Life Technologies). Se quitaron carriles de gel completos y se dividieron de arriba a abajo en 11 bandas. Las bandas de gel se destiñeron con acetonitrilo al 50 %/bicarbonato de amonio 50 mM, se redujeron con ditiotretol (concentración final 50 mM) durante 30 minutos a 50 °C, y se alquilaban con yodoacetamida (concentración final 50 mM) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos. Las muestras se digirieron después a 37 °C durante la noche con 0,02 µg/µl de tripsina (Promega) en bicarbonato de amonio 50 mM. Las muestras digeridas se inyectaron en una columna capilar de diámetro interno de 100 µm (columna UPLC NanoAcquity, 100 µm x 100 mm, 1,7 µm, BEH130 C18, Waters Corp) y se separaron por cromatografía capilar de fase inversa en un sistema de UPLC NanoAcquity (Waters Corp). Las muestras se cargaron en ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua y se eluyeron con un gradiente de 2-90 % de tampón B (donde el tampón A es ácido fórmico al 0,1 %/acetonitrilo al 2 %/ agua al 98 % y el tampón B es ácido fórmico al 0,1 %/agua al 2 %/acetonitrilo al 98 %) a 1,00 µl/min con un tiempo de análisis total de 45 minutos. Los péptidos se eluyeron directamente en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher) y se ionizaron usando una fuente ADVANCE (Michrom-Bruker) con un voltaje de pulverización de 1,4 kV. Los datos del espectro de masas se obtuvieron utilizando un método que comprende una exploración MS completa (375-1600 m/z) en el Orbitrap a una resolución de 60.000 M/ΔM a m/z 400 seguido de disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés) de los 8 primeros iones más abundantes detectados en la exploración MS completa en un ciclo repetido a lo largo del gradiente de LC en la trampa iónica lineal. Los resultados del espectro de masas se enviaron para la búsqueda en la base de datos utilizando el algoritmo de búsqueda Mascot® versión 2.3.02 (Matrix Sciences) contra una base de datos concatenada de diana-señuelo, Uniprot ver 2010_12, que comprende proteínas de *S. aureus* y contaminantes comunes de laboratorio. Se buscaron los datos con especificidad triptica, modificaciones variables de la carbamidometilación de cisteína (+57,0215 Da) y oxidación de metionina (+15,995 Da), lo que permite 2 errores de escisión, 20 ppm de masa de iones precursores, y especificación de tolerancia de masa de iones de fragmento de 0,5 Da. Las coincidencias espectrales de péptidos se filtraron usando un algoritmo discriminante lineal (LDA, por sus siglas en inglés) a una tasa de falso descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) del 1 %.

Ejemplo 26 Escisión por estafopaina de péptidos de FRET y AAC tioFab

Se incubaron 5 µM de tioFAB 4497 MP-LAFGA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) y tioFAB 4497 MP-LAFAA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) (Figura 30) con 50 nM de proteasa en PBS pH 7,2, L-Cys 4 mM, EDTA 2,5 mM durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se desactivaron por dilución 1:1 con TFA al 1 %. Las muestras se ejecutaron posteriormente en LC-MS para determinar el porcentaje de escisión del enlazador. Todas las proteasas probadas escindieron los dos enlazadores, aunque en diferentes grados y ubicaciones (Tabla 4). La estafopaina A y la estafopaina B escinden los enlazadores en los mismos sitios: MP-LAFG↓A-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) y MP-LAF↓A-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136). La estafopaina B logra una escisión del 100 % de ambos enlazadores a la concentración probada. La catepsina B también logró una escisión del 100 % para ambos enlazadores en estas condiciones, aunque los sitios de escisión fueron mixtos. La Catepsina B escindió mal-LAFGA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) exclusivamente en MP-LAFG↓A-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135), mientras escindió mal-LAFAA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) en MP-LAF↓A-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) y MP-LAFAA↓-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136). La escisión de MP-LAFAA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 136) por estafopaina A fue del 23 %, mientras que la escisión de m MP-LAFGA-QSY7 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 135) fue del 38 %.

Se incubaron 5 µM de AAC-193 con 50 nM de proteasa en PBS pH 7,2, L-Cys 4 mM, EDTA 2,5 mM o citrato de sodio 100 mM pH 5, NaCl 100 mM, L-Cys 4 mM, EDTA 2,5 mM durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, las reacciones de escisión se desactivaron por dilución 1:1 con TFA al 1 %. Las muestras se ejecutaron posteriormente en LC-MS para determinar el porcentaje de escisión del enlazador. El enlazador-antibiótico optimizado fue escindido eficazmente por todas las proteasas probadas. Tras la escisión por estafopaina A y estafopaina B, se liberó piperazino-rifamicina libre. La estafopaina B logró una escisión del 100 % a pH 5 y 7,2. La estafopaina A mostró una escisión del 100 % a pH 5 y una escisión del 64 % a pH 7,2.

Ejemplo 27 El conjugado anticuerpo-antibiótico, tio-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) AAC-215, inhibe *S. aureus* in vitro:

Se suspendieron 1x10⁸ bacterias Wood46 en fase estacionaria en 10 µl de tampón HB (solución salina equilibrada de Hanks complementada con Albúmina De Suero Bovino al 0,1 %) que contenía 100 µg/ml de AAC-215, tio-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) (péptido del núcleo "divulgado como SEQ ID NO: 128) o AAC 126, tio-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperaz-BOR). Este último utiliza un enlazador escindible por catepsina B de valina-citrulina (vc) para suministrar el mismo antibiótico.

Después de 1 hora, las muestras se diluyeron 10 veces mediante la adición de 90 µl de HB o 90 µl de catepsina B

(10 µg/ml de catepsina B en acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, L-Cisteína 5 mM, pH 5) y se incubaron a 37 °C durante 3 horas adicionales. La liberación del antibiótico activo se infirió determinando si la incubación de los AAC con la bacteria era capaz de inhibir el crecimiento bacteriano posterior. Las suspensiones de bacterias/AAC se detectaron directamente sobre placas de Agar de Soja Tríplico y se visualizó el crecimiento bacteriano después de la incubación durante la noche a 37 °C. El fármaco activo se libera de AAC conjugado con el producto intermedio enlazador-antibiótico, MC-LAFG-PAB-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128).

Las bacterias que se incubaron sin AAC crecieron bien y no se vieron afectadas por el tratamiento con catepsina B. Las bacterias tratadas con AAC-126 que contienen el enlazador escindible por catepsina B, valina-citrulina (vc) crecieron bien después de la incubación en tampón HB solo, pero no pudieron crecer después del tratamiento con AAC-126 + Catepsina B, indicando que se requirió el tratamiento enzimático para liberar antibiótico activo. Por el contrario, las bacterias incubadas con AAC-215 que contiene el enlazador escindible por estafopaina LAFG (SEQ ID NO: 128) no pudieron crecer después de la incubación con tampón HB solo, sugiriendo que la suspensión bacteriana contenía actividad enzimática que era suficiente para liberar el antibiótico activo del AAC con enlazador escindible por estafopaina.

Ejemplo 28 El conjugado anticuerpo-antibiótico, AAC -193, tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) destruye MRSA intracelular en un ensayo de macrófagos:

La cepa USA300 de *S. aureus* se incubó con diferentes dosis (100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml o 0,1 µg/ml) de anticuerpo S4497 solo, tio-S4497 HC WT (v8) (SEQ ID NO: 137), AAC-192 LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) o AAC-193 tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) para permitir la unión del AAC a la bacteria (Figura 31). S4497 HC WT (v8) 446aa

```
EVQ LVE SGG GLV QPG GSL RLS CSA SGF SFN SFW MHW VRQ VPG KGL VWI SFT NNE GTT TAY
ADS VRG RFI ISR DNA KNT LYL EMN NLR GED TAV YYC ARG DGG LDD WGQ GTL VTV SSA STK
GPS VFP LAP SSK STS GGT AAL GCL VKD YFP EPV TVS WNS GAL TSG VHT FPA VLQ SSG LYS
LSS VVT VPS SSL GTQ TYI CNV NHK PSN TKV DKK VEP KSC DKT HTC PPC PAP ELL GGP SVF
LFP PKP KDT LMI SRT PEV TCV VVD VSH EDP EVK FNW YVD GVE VHN AKT KPR EEQ YNS TYR
VVS VLT VLH QDW LNG KEY KCK VSN KAL PAP IEK TIS KAK GQP REP QVY TLP PSR EEM TKN
QVS LTC LVK GFY PSD IAV EWE SNG QPE NNY KTT PPV LDS DGS FFL YSK LTV DKS RWQ QGN
VFS CSV MHE ALH NHY TQK SLS LSP GK
```

(SEQ ID NO: 137)

Después de 1 hora de incubación, las bacterias opsonizadas se proporcionaron a macrófagos murinos y se incubaron a 37 °C durante 2 horas para permitir la fagocitosis. Después de completar la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después sembrando en placa diluciones en serie de los lisados de macrófagos sobre placas de Agar de Soja Tríplico (Figura 31). El AAC escindible por estafopaina fue capaz de destruir las USA300 intracelular con una potencia similar en comparación con el AAC escindible por catepsina B. La línea discontinua gris indica el límite de detección para el ensayo (10 UFC/pocillo).

Ejemplo 29 Los AAC actúan de forma selectiva en la destrucción por antibióticos de *S. aureus* a través de la unión específica a antígeno del anticuerpo:

Se eligió la cepa Wood46 de *S. aureus* porque no expresa proteína A, una molécula que se une a la región Fc de los anticuerpos IgG. La cepa Wood46 de *S. aureus* se incubó con 10 µg/ml o 0,5 µg/ml de anticuerpo S4497, AAC de control de isotipo que contiene un enlazador escindible por catepsina B, AAC-101 tio-trastuzumab HC A118C-MC-vc-PAB-(dimetil-pipBOR), AAC-192 tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(dimetilpipBOR), AAC de control de isotipo que contiene un enlazador escindible por estafopaina, tio-trastuzumab HC A118C-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) o AAC-193 tio-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) durante 1 hora para permitir la unión de los AAC a las bacterias (Figura 32). Para limitar la unión no específica de los AAC, las bacterias opsonizadas se centrifugaron, se lavaron una vez y se resuspendieron en tampón antes de que se proporcionaran a los macrófagos murinos. Después de completar la fagocitosis, la mezcla de infección se reemplazó con medio de crecimiento normal complementado con 50 µg/ml de gentamicina para destruir cualquier bacteria extracelular restante y se determinó el número total de bacterias intracelulares supervivientes 2 días después sembrando en placa diluciones en serie de los lisados de macrófagos sobre placas de Agar de Soja Tríplico (Figura 32). El AAC que contiene un enlazador escindible por estafopaina, AAC-193, fue capaz de destruir todas las bacterias intracelulares detectables, mientras que el AAC de control de isotipo no mostró actividad. El ensayo de macrófagos demuestra que los AAC escindibles por estafopaina pueden destruir las bacterias intracelulares. El conjugado anticuerpo-antibiótico, AAC-125 tio-S4497 LC v8-MP-LAFG-PA-BC-(piperazinoBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 128) es eficaz en un

modelo de infección por MRSA *in vivo*:

Los ratones CB17.SCID se reconstituyeron con IgG humana usando una pauta posológica optimizada para producir niveles constantes de al menos 10 mg/ml de IgG humana en suero. Los ratones fueron tratados con anticuerpo 4497(50 mg/kg), AAC-215 con enlazador escindible por estafopaina (50 mg/kg) o un control de isotipo, AAC anti-gD que contiene un enlazador escindible por estafopaina (50 mg/kg). Los ratones recibieron una dosis única de AAC-215 el día 1 después de la infección por inyección intravenosa. Todos los ratones se sacrificaron el día 4 después de la infección y se determinó el número total de bacterias supervivientes en 2 riñones (Figura 33) o en corazón (Figura 34) mediante siembra en placas. El tratamiento con AAC-215 que contiene un enlazador escindible por estafopaina redujo las cargas bacterianas por debajo del límite de detección en 6 de los 8 ratones analizados, mientras que el AAC de control de isotipo mostró actividad limitada. La línea discontinua indica el límite de detección para el ensayo (333 UFC/ratón).

Ejemplo 30 Crecimiento de *S. aureus* y perfil de actividad de proteasas:

La cepa Wood46 de *Staphylococcus aureus* (ATCC10832) se cultivó durante la noche a 37 °C en caldo de soja triptico (TSB) con agitación. Los cultivos se centrifugaron a 10.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se recogió y se hizo pasar a través de dos filtros de 0,22 µm.

Perfil de actividad de proteasas de *S. aureus*: Se concentraron 150 ml de sobrenadante de cultivo y se intercambió el tampón en solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando TFF (Millipore Pellicon XL Cassette Biomax 10kDa) hasta un volumen final de 38 ml con una concentración final de proteína total de 1 mg/ml. El ensayo de actividad de proteasas del sobrenadante de Wood46 se realizó utilizando la Biblioteca de Perfiles de Endopeptidasas Rápidas o REPLi (Mimotopes, Victoria, Australia). La biblioteca consta de 3375 péptidos fluorogénicos desactivados internamente en un formato de 96 pocillos dispuestos en 512 grupos. Los péptidos de la biblioteca contienen la secuencia MCA-Gly-Gly-Gly-Xaa-Yaa-Zaa-Gly-Gly-DPA-Lys-Lys (SEQ ID NO: 132) donde MCA corresponde al ácido 7-metoxicumarina-4-acético (donante fluorescente) y DPA corresponde al ácido N^b-(2,4-dinitrofenil)-L-2,3-diaminopropiónico (aceptor de fluorescencia). Los pocillos que contenían 5 nmoles de péptidos de FRET se solubilizaron en 5 µl de acetonitrilo al 50 % (Sigma). Se añadieron 50 µl (microlitros) del sobrenadante de Wood46 concentrado y 50 µl de PBS a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C y se tomaron medidas de fluorescencia a los 0, 30, 60, 140 y 170 minutos. Los datos de fluorescencia se obtuvieron en un Tecan Sapphire², excitación 320nm/emisión 400nm. El factor de cambio de la intensidad de fluorescencia del criterio de valoración se calculó como $F_{\text{final}}/F_{\text{inicial}}$.

Los sitios de escisión del sustrato se determinaron por LC-MS realizada con un Agilent Q-TOF usando una fuente ESI. Se inyectaron 10 µl de cada pocillo y se separaron por cromatografía de fase inversa en una columna Waters Xbridge OST C18 2,5µm (4,6 x 50 mm) usando un sistema Agilent 1260 HPLC. Las muestras se eluyeron con un gradiente de 2-90 % de tampón B (donde el tampón A es ácido trifluoroacético al 0,05 %/ agua al 99,95% y el tampón B es ácido trifluoroacético al 0,04 %/acetonitrilo al 99,96%) a 500 µl/min con un tiempo de análisis total de 20 minutos. Los péptidos se eluyeron directamente en un espectrómetro de masas Q-TOF. Los productos de escisión se asignaron basándose en la comparación de los pesos moleculares observados con las masas calculadas correspondientes a la escisión en cada sitio posible.

Ejemplo 31 Síntesis del enlazador peptídico de FRET con maleimida:

El péptido de FRET con maleimida, (MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) de la Figura 26 se sintetizó mediante química en fase sólida de Fmoc convencional usando un sintetizador de péptidos PS3 (Protein Technologies, Inc.). Se usaron 0,1 mmol de resina Fmoc-Lys(Boc)-Rink amida (Novabiochem) para generar una carboxamida C-terminal. Se añadió Fmoc-Lys(Mtt)-OH (Novabiochem) en el primer resto N-terminal para permitir una determinación química adicional de la cadena lateral después de la eliminación del grupo Mtt. Un aceptor de fluorescencia, 5(6)-carboxitetrametilrodamina o TAMRA (Novabiochem), se unió a esta amina de cadena lateral en la resina después de que el grupo Mtt se eliminara por tres lavados consecutivos de 30 minutos de TFA al 1 % en diclorometano con triisopropilsilano (TIS) al 3 %. La reacción se dejó proceder durante 20 horas. Después de esta etapa, el grupo Fmoc terminal se elimina con piperidina al 20% en DMF y se acopla con ácido maleimido-propiónico (Bachem AG) mediante HBTU. Los péptidos intermedios marcados con TAMRA se separaron de la resina con ácido trifluoroacético (TFA)/TIS/agua 95:2,5:2,5) (v/v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La solución de escisión se filtró y se evaporó en una corriente de nitrógeno para eliminar el TFA. Los intermedios en bruto disueltos en una mezcla de agua y acetonitrilo se sometieron a purificación adicional por HPLC de fase inversa con una columna Júpiter de 5 µl C4 (5 µm, 10 mm x 250 mm) de Phenomenex. Después de la liofilización, los intermedios purificados se hicieron reaccionar con 10 equivalentes de NHS-fluoresceína (Thermo Scientific) en solución salina tamponada con fosfato 50/50 (PBS)/dimetilformamida (DMF) (v/v) durante 20 horas para marcar la amina libre en la lisina C-terminal. El péptido de FRET se purificó y liofilizó como se describe anteriormente. Todas las mezclas de reacción y productos finales se analizaron y confirmaron por LC-MS.

Síntesis en fase sólida de enlazadores: Todos los enlazadores descritos se sintetizaron usando química en fase

sólida de Fmoc convencional en un sintetizador de péptidos PS3 (Protein Technologies, Inc.). Se utilizó 0,1 mM de resina Fmoc-aminoácido-Wang (Novabiochem) para todos los enlazadores para generar un carboxilo C-terminal. Los enlazadores se purificaron como se describe anteriormente. La unión de QSY7 amina (Invitrogen) se realizó haciendo reaccionar los enlazadores purificados con un exceso molar de 1,1 veces de QSY7 amina, un exceso molar de 1,1 veces de HATU y un exceso molar de 2,2 veces de DIEA en DMF durante la noche a temperatura ambiente. Las especies de enlazador-QSY7 se purificaron como se describe anteriormente. Todas las mezclas de reacción y productos finales se analizaron y confirmaron por LC-MS.

Ejemplo 32 Ensayos de escisión FRET basados en células:

Los cultivos de Wood46 y USA300 se inocularon con una dilución 1:200 de cultivos durante la noche (0,1 ml en 20 ml) en TSB y se incubaron a 37 °C con agitación. Las cepas se cultivaron hasta la fase exponencial de crecimiento y se sembraron en placas a densidades celulares de 10^8 células/ml y 10^7 células/ml en caldo de soja tréptico (TSB). Los conjugados de tioMAB péptido de FRET se añadieron a los pocillos a una concentración final de péptido de FRET de 2 µM. Las placas se incubaron a 37 °C y la fluorescencia se controló a lo largo del tiempo, excitación 495nm/emisión 518nm, durante 210 minutos.

Escisión de tioFAB péptido de FRET y tioFAB mal-GGAFAGGG-DNA31 ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) por sobrenadante activo concentrado: tioFAB S4497 conjugado con MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys(fluoresceína) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 125) o LA-59 MP-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-(pipBOR) ("péptido del núcleo" divulgado como SEQ ID NO: 126) se incubaron con sobrenadante de Wood46 concentrado que se había procesado como se describe anteriormente. TioFAB S4497 y el sobrenadante se mezclaron 1: 1 sobre una base de miligramos (25 µg de tioFAB S4497 con 25 µg de sobrenadante proteico) en PBS. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A las 2 horas, la reacción se desactivó diluyendo 1:1 con TFA al 0,1 %. Las muestras se analizaron por LC-MS para determinar la cantidad de escisión y los productos de escisión.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, no debe interpretarse que las descripciones y ejemplos limitan el ámbito de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GENENTECH, INC.

<120> ANTICUERPOS Y CONJUGADOS ANTI TEICÓICOS DE PARED

<130> P4960R2-WO

<140>

<141>

<150> 14/284.609

<151> 22/05/2014

<150> 61/829.461

<151> 31/05/2013

<160> 180

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 1

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Arg Ala Asn Asn Asn Tyr Tyr Val
1 5 10 15

Ala

5 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 2

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe
1 5

15 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 3

Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr
1 5

30 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

40 <400> 4

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

45 <210> 5
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 5

Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 6

Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 7

Arg Ser Asn Gln Asn Leu Leu Ser Ser Ser Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 8

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 9

Gln Gln Tyr Tyr Ala Asn Pro Arg Thr
1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 10

 Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5

 <210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 20
 <400> 11

 Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

 Asp
 25
 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 35
 <400> 12

 Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile
 1 5 10

 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 45
 <400> 13
 50
 Lys Ser Asn Gln Asn Val Leu Ala Ser Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

 Ala

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 14
 Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser
 1 5
 15 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 15
 Gln Gln Tyr Tyr Thr Asn Pro Arg Thr
 25 1 5
 30 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 16
 Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5
 40 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 50 <400> 17
 Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly
 55 <210> 18
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 18

Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile
1 5 10

10

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

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

20

<400> 19

Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

25

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> fuente

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

<400> 20

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

35

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

45

<400> 21

Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

50

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 22
 5
 Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

 <210> 23
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 23

 Ile Ile His Pro Gly Asp Ser Lys Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

 Gly
 20
 <210> 24
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 30 <400> 24

 Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe Ser Ser
 1 5 10 15

 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val
 20 25

 35 <210> 25
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 25

ES 2 793 174 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Arg
20 25 30

Ala Asn Asn Asn Tyr Tyr Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

- 5 <210> 26
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
- <400> 26

ES 2 793 174 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Lys Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 27

ES 2 793 174 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Asn Gln Asn Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75 80

Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
85 90 95

Tyr Ala Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 28

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ES 2 793 174 T3

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

Ala Lys Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Asn Gln Asn Val Leu Ala Ser
20 25 30

Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Phe
100 105 110

Asn

15

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

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

25

<400> 30

ES 2 793 174 T3

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Leu Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 31

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

ES 2 793 174 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Ile Glu

<210> 32

<211> 138

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 32

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile His Pro Gly Asp Ser Lys Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe
100 105 110

Ser Ser Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 10
 <400> 33
 Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp Leu Ala
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 20
 <400> 34
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5
 25
 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 35
 <400> 35
 Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
 1 5
 40
 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 36
 50
 Ser Tyr Asp Ile Asn
 1 5
 55
 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente

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

<400> 37

Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

5

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 38

Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

20

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

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

<400> 39

30

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

<210> 40

<211> 7

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

40

<400> 40

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

45

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

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

55

<400> 41

ES 2 793 174 T3

Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
1 5

5 <210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 42

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

15

20 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 43

Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

30 <210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 44

40 Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

50 <400> 45

Arg Ala Ser Gln Phe Val Ser Arg Thr Ser Leu Ala
1 5 10

5 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 46

Glu Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

15 <210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 47

25 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 48

His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro Arg Thr
 1 5

35 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 49

Asn Tyr Asp Phe Ile
 1 5

45 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT

Trp Met Asn Pro Asn Ser Tyr Asn Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

55 <210> 50
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 50

	Ala	Val	Arg	Gly	Gln	Leu	Leu	Ser	Glu	Tyr
	1				5					10

10 <210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

20 <400> 51

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala
	1				5					10		

25 <210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 52

	Asp	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr
	1				5		

35 <210> 53
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 53

	Gln	Lys	Tyr	Gly	Ser	Thr	Pro	Arg	Pro
	1				5				

50 <210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 54

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

5 <210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 55

Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

15 Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
25 <400> 56

Glu Arg Trp Ser Lys Asp Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

30 <210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 57

Arg Ala Ser Leu Asp Ile Thr Asn His Leu Ala
1 5 10

45 <210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 58

ES 2 793 174 T3

Glu Ala Ser Ile Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 59

Glu Lys Cys Asn Ser Thr Pro Arg Thr
1 5

15 <210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 60

Asn Tyr Asp Ile Asn
1 5

30 <210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 61

Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Pro Lys Phe Arg
1 5 10 15

40 Gly

<210> 62
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

50 <400> 62

Gly Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asn Tyr His Ile Ser Gly Leu
1 5 10 15

Asp Val

5 <210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ala Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

15 <210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 64

Gly Val Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

30 <210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 65

Gln Leu Tyr Thr Ser Ser Arg Ala Leu Thr
1 5 10

40 <210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 66

Ala Tyr Ala Met Asn
1 5

5 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 67

 Ser Ile Thr Lys Asn Ser Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 15 <210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 68

 25 Leu Ala Ala Arg Ile Met Ala Thr Asp Tyr
 1 5 10

 30 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 69

 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
 1 5 10

 40 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 70

 Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

 55 <210> 71
 <211> 9

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 71

Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 72
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 72

Tyr Tyr Ser Met Ile

1 5

<210> 73
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 73

Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 74
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 74

Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg Pro Phe
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 75
<211> 11

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 75

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
 1 5 10

10 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 76

Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 77
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 77

35 Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Ser
 1 5

40 <210> 78
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 45 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 78

Tyr Tyr Ser Met Ile
 1 5

50 <210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 79

Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 80

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

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

15

<400> 80

Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg Pro Phe
 1 5 10 15

Asp Tyr

20

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

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

<400> 81

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Val Ala
 1 5 10

30

<210> 82

<211> 7

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

40

<400> 82

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5

45

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

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

<400> 83

Leu Gln Tyr Asn Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

5 <210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 84

15 Thr Asn Asp Met Ser
1 5

20 <210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 85

Thr Ile Ile Gly Ile Asp Asp Thr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

30 <210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 86

Asn Ser Gly Ile Tyr Ser Phe
1 5

45 <210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 87

ES 2 793 174 T3

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Ala
1 5 10

5 <210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 88

Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

15 <210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 89

Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His Ser
1 5

30 <210> 90
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 90

Asp Tyr Ala Met Gly
1 5

40 <210> 91
<211> 17
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
50 <400> 91

Val Val Thr Gly His Ser Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 92

 Arg Ile Trp Ser Tyr Gly Asp Asp Ser Phe Asp Val
 1 5 10

 15 <210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 93

 25 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Arg Leu Ala
 1 5 10

 30 <210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 94

 Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly
 1 5

 40 <210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 95

 Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
 1 5

 55 <210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>

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

<400> 96

5

Ser Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 97
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

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

15

<400> 97

Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

20

<210> 98
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

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

30

<400> 98

Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser
 1 5 10

35

<210> 99
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

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

<400> 99

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu
 1 5 10 15

45

Asn

<210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

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

55

<400> 100

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

5 <210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 101

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 102
<211> 5
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
25 <400> 102

Ser Phe Trp Met His
1 5

30 <210> 103
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 103

40 Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

45 <210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 104

Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp
1 5

5 <210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 105

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

15 <210> 106
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 106

25

Val Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

30 <210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 107

Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Tyr Thr
 1 5

40 <210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 108

50

Ser Gly Tyr Tyr Asn
 1 5

55 <210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<221> fuente

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

<400> 109

5

Tyr Ile Leu Ser Gly Ala His Thr Asp Ile Lys Ala Ser Leu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 110

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15

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

<400> 110

Ser Gly Val Tyr Ser Lys Tyr Ser Leu Asp Val
1 5 10

20

<210> 111

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

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

30

<400> 111

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

35

<210> 112

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> 1

10 <223> Xaa = Gln o Glu

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

15 <223> Xaa = Met o Ile o Val

<400> 112

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

20

<210> 113

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

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

30

<400> 113

ES 2 793 174 T3

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

<210> 114

<211> 453

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 114

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

ES 2 793 174 T3

225		230		235		240									
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315					320
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
		355					360					365			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	370					375					380				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385					390					395					400
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			420					425					430		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
		435					440					445			
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly											
				450											

<210> 115

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

5

<400> 115

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
 85 90 95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 116
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 2
 <223> Xaa = Met o Ile o Val

<400> 116

Glu	Xaa	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr
			20				25						30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Met	Asn	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp
			100					105					110		
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155				160	
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
	210					215				220					
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235				240	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315				320	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
				325					330					335	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
			340					345					350		
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
		355					360					365			

Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
370						375					380				
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
385					390					395					400
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
				405					410					415	
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
			420					425					430		
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
		435					440					445			
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly											
				450											

<210> 117

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> 2

15 <223> Xaa = Met o Ile o Val

<400> 117

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 118

Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp
 1 5

<210> 119

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 119

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
 20 25 30

Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln

ES 2 793 174 T3

35

40

45

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 120

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 120

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 121
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

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

10

<400> 121

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
 20 25 30

Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

<210> 122
 <211> 445
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

 <400> 122

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

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

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

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

 Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

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

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

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

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

 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

ES 2 793 174 T3

180								185					190				
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
		195					200					205					
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
	210					215					220						
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe		
225					230					235					240		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro		
				245					250					255			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val		
			260					265					270				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr		
		275					280					285					
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val		
	290					295					300						
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys		
305					310					315					320		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser		
				325					330					335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro		
			340					345					350				
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val		
		355					360					365					
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly		
	370					375					380						
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp		
385					390					395					400		
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp		
				405					410					415			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His		
			420					425					430				

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

5 <210> 123
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 123

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
20 25 30

Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

ES 2 793 174 T3

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

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 124

<211> 444

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 124

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

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

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

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

ES 2 793 174 T3

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

5 <210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys(TAMRA)

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Lys(fluoresceína)

<400> 125

Lys Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly Lys
1 5 10

25 <210> 126
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

35 <400> 126

Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly
1 5

40 <210> 127
<211> 448
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 127

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

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

50

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445

<210> 128

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 128

Leu Ala Phe Gly

1

15

<210> 129

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Ile(me)

 <400> 129

 Gly Pro Ile Leu Phe Phe
 1 5
 10
 <210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 20 <400> 130

 Gly Pro Ile Leu Phe Phe
 1 5

 <210> 131
 25 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

 <400> 131

 Gly Gly Ala Phe Ala
 1 5
 35
 <210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> DPA
 55
 <400> 132

 Gly Gly Gly Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa Lys Lys
 1 5 10
 60 <210> 133

<211> 450
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 133

10

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

ES 2 793 174 T3

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

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

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

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 134
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 134

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser Trp Gly
100 105 110

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

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

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

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

ES 2 793 174 T3

Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	225	230	235	240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	245	250	255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	260	265	270	
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	275	280	285	
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	290	295	300	
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	305	310	315	320
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	325	330	335	
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	340	345	350	
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	355	360	365	
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	370	375	380	
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	385	390	395	400
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	405	410	415	
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				

ES 2 793 174 T3

420

425

430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly
450

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 135

Leu Ala Phe Gly Ala
1 5

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 136

Leu Ala Phe Ala Ala
1 5

<210> 137
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 137

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

ES 2 793 174 T3

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

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

Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 138

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 138

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

305					310					315					320				
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser				
				325					330					335					
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro				
			340					345					350						
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val				
		355					360					365							
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly				
	370					375					380								
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp				
385					390					395					400				
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp				
				405					410					415					
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His				
			420					425					430						
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly							
		435					440					445							

<210> 139
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 139

Glu	Met	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Met	Asn	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr

ES 2 793 174 T3

65					70						75				80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp
			100					105					110		
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
	210					215					220				
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235					240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245				250						255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295					300				
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
305					310					315					320

ES 2 793 174 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 140

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 140

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

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

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

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 793 174 T3

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp		
			100					105					110				
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys		
		115					120					125					
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly		
	130					135					140						
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro		
145					150					155					160		
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr		
				165					170					175			
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val		
			180					185					190				
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn		
		195					200					205					
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro		
	210					215					220						
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu		
225					230					235					240		
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
				245				250						255			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
			260					265					270				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
		275					280					285					
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		
	290					295					300						
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp		
305					310					315					320		

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 141

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 141

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

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

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

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 793 174 T3

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
			85						90					95		
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	
			100					105					110			
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	
		115					120					125				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
	130					135					140					
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
145					150					155				160		
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
				165					170					175		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
			180					185					190			
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
		195					200					205				
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
	210					215					220					
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
225					230					235					240	
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
				245					250					255		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
			260					265					270			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
		275					280					285				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	
	290					295					300					
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	
305					310					315					320	

ES 2 793 174 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 142

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 142

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

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

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

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

[illegible]

<210> 143
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```
<220>
<221> fuente
<223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
<400> 143
```

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1			5						10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Asp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Trp	Met	Asn	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe

ES 2 793 174 T3

50						55						60			
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp
			100					105					110		
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys
		115					120					125			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130					135					140				
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145					150					155					160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165					170					175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
		195					200					205			
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
	210					215					220				
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225					230					235					240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
				245					250					255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
			260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
		275					280					285			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
	290					295					300				

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 144

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 144

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

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

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

ES 2 793 174 T3

Gly	Trp	Met	Asn	Ala	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	100	105	110	
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	115	120	125	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	130	135	140	
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	145	150	155	160
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	165	170	175	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	180	185	190	
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	195	200	205	
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	210	215	220	
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	225	230	235	240
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	245	250	255	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	275	280	285	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	290	295	300	

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 145

<211> 220

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 145

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
20 25 30

Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

ES 2 793 174 T3

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

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

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

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

Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 146

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 146

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 147

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 147

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

290	295	300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320		
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335		
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350		
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 355 360 365		
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 370 375 380		
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 385 390 395 400		
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 405 410 415		
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 420 425 430		
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440 445		

<210> 148
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 148

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr 65 70 75 80

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

ES 2 793 174 T3

5 <210> 149
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 149

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

ES 2 793 174 T3

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 793 174 T3

<210> 151
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 151

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 152
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

20

<400> 152
 cccagactgc accagctgga tctctgaatg tactccagtt gc 42

25

<210> 153
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"

35

<400> 153
 ccagactgca ccagctgcac ctctgaatgt actccagttg c 41

<210> 154
 <211> 61

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 154
 ccagggttcc ctggccccaw tmgtaagtc cawcwkacc tcttgacag taatagacag 60
 10 c 61
 <210> 155
 <211> 52
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético"
 20 <400> 155
 cctggcccca gtcgtcaagt cctccttcac ctcttgaca gtaatagaca gc 52
 25 <210> 156
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 156
 35
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
 35 40 45
 Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 793 174 T3

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 157

<211> 445

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 157

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
20 25 30

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

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

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

Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

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

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

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

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

ES 2 793 174 T3

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

ES 2 793 174 T3

420

425

430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 158

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 158

ES 2 793 174 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 159
<211> 215
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 159

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Val Ser Arg Thr
20 25 30

Ser Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu

165

170

175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 160
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 160

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Gly Ser Thr Pro
 85 90 95

Arg Pro Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser

[illegible]

<210> 161
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 161

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

ES 2 793 174 T3

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 162

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 162

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ala Ile
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Arg Ala Pro Thr Leu Leu
35 40 45

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

Cys Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Leu Tyr Thr Ser Ser Arg
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

ES 2 793 174 T3

115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 163

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 163

ES 2 793 174 T3

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

- 5 <210> 164
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <221> fuente

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

<400> 164

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly
          20           25           30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Asp Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro
          85           90           95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 165

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

5

<400> 165

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

Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn
20 25 30

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

Ser Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ala Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Thr Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

<210> 166

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 166

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

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Phe Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His
85 90 95

Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

<210> 167

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

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

<400> 167

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Asp	Arg
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Val	Leu	Ile
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

10

ES 2 793 174 T3

35

40

45

Tyr Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 168

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 168

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Phe Thr Asn His Tyr

ES 2 793 174 T3

[illegible]

<210> 169
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 169

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 355 360 365
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445
 Ser Leu Ser Pro Gly
 450

<210> 170

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 170

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 171

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 171

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

ES 2 793 174 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Lys Asn Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Glu Arg Trp Ser Lys Asp Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

ES 2 793 174 T3

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

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

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 172

<211> 456

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 172

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

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

	260		265		270										
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
	275						280					285			
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	290					295					300				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
305					310						315				320
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
				325					330					335	
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
			340					345					350		
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
		355					360					365			
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
	370					375					380				
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
385					390					395					400
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
				405					410					415	
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
			420					425					430		
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
		435					440					445			
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								
	450					455									

<210> 173

<211> 448

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 173

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly

ES 2 793 174 T3

1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu
20	Ser	Cys	Ala
Thr	Ser	Gly	Phe
25	Pro	Phe	Ser
30	Ala	Tyr	
Ala	Met	Asn	Trp
35	Val	Arg	Gln
40	Pro	Gly	Arg
45	Leu	Glu	Trp
Val			
Ser	Ser	Ile	Thr
50	Lys	Asn	Ser
55	Asp	Ser	Leu
60	Tyr	Tyr	Ala
65	Asp	Ser	Val
70			
Lys	Gly	Arg	Phe
75	Thr	Ile	Ser
80	Arg	Asp	Asn
85	Ala	Gly	Asn
90	Ser	Leu	Tyr
95	Cys		
Leu	Gln	Met	Asn
100	Ser	Leu	Arg
105	Val	Glu	Asp
110	Thr	Ala	Val
115	Tyr	Tyr	Cys
120			
Ala	Thr	Leu	Ala
125	Arg	Ile	Met
130	Ala	Thr	Asp
135	Tyr	Trp	Gly
140	Gln	Gly	
145			
Thr	Leu	Val	Thr
150	Val	Ser	Ser
155	Ala	Ser	Thr
160	Lys	Gly	Pro
165	Ser	Val	Phe
170			
Pro	Leu	Ala	Pro
175	Ser	Ser	Lys
180	Ser	Thr	Ser
185	Gly	Gly	Thr
190	Ala	Ala	Leu
195			
Gly	Cys	Leu	Val
200	Lys	Asp	Tyr
205	Phe	Pro	Glu
210	Pro	Val	Thr
215	Val	Ser	Trp
220			
Asn	Ser	Gly	Ala
225	Leu	Thr	Ser
230	Gly	Val	His
235	Thr	Phe	Pro
240	Ala	Val	Leu
245			
Gln	Ser	Ser	Gly
250	Leu	Tyr	Ser
255	Leu	Ser	Ser
260	Val	Val	Thr
265	Val	Pro	Ser
270			
Ser	Ser	Leu	Gly
275	Thr	Gln	Thr
280	Tyr	Ile	Cys
285	Asn	Val	Asn
290	His	Lys	Pro
295			
Ser	Asn	Thr	Lys
300	Val	Asp	Lys
305	Lys	Lys	Val
310	Glu	Pro	Lys
315	Ser	Cys	Asp
320	Lys		
325			
Thr	His	Thr	Cys
330	Pro	Pro	Cys
335	Pro	Ala	Pro
340	Glu	Leu	Leu
345	Gly	Gly	Pro
350			
Ser	Val	Phe	Leu
355	Phe	Pro	Pro
360	Lys	Pro	Lys
365	Asp	Thr	Leu
370	Met	Ile	Ser
375			

ES 2 793 174 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 174

<211> 456

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 174

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

ES 2 793 174 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg
 100 105 110
 Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

ES 2 793 174 T3

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 175

<211> 456

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 175

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

ES 2 793 174 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ala Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg
 100 105 110
 Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270

ES 2 793 174 T3

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
275 280 285

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
305 310 315 320

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
340 345 350

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 176

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 176

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

ES 2 793 174 T3

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

ES 2 793 174 T3

	260		265		270										
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
	275						280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345					350		
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375					380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405					410					415	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420					425					430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
		435					440					445			

<210> 177

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota= "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 177

Ala	Arg	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu
1				5		

15

<210> 178

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

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

10

<400> 178

Ala Arg Gly Asp Ala Gly Leu
 1 5

15

<210> 179
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

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

<400> 179

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu
 1 5

25

<210> 180
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

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

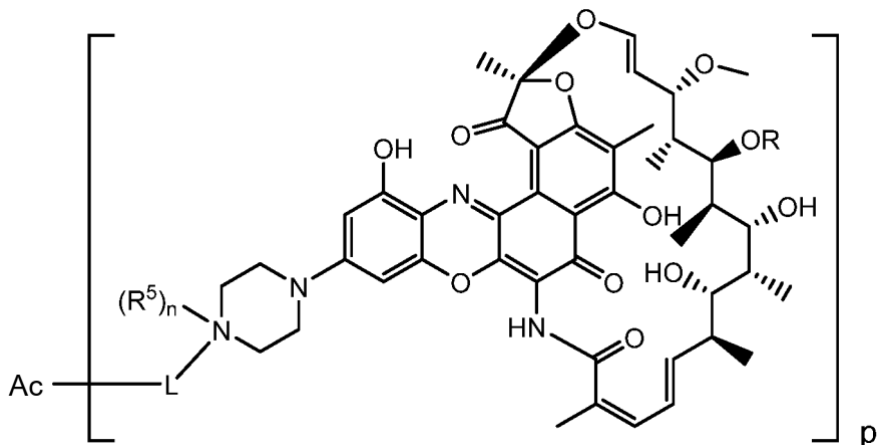
35

<400> 180

Ala Arg Gly Ala Gly Gly Leu
 1 5

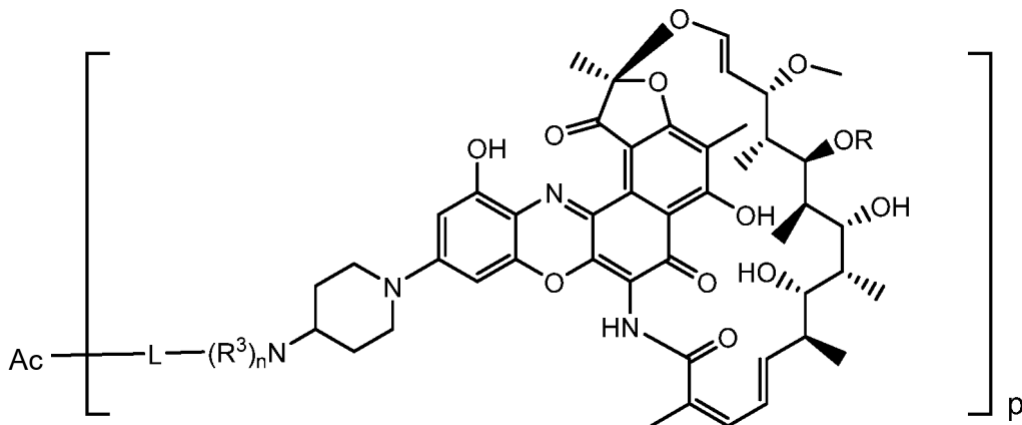
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico que comprende un anticuerpo monoclonal anti-ácidos teicoicos de pared (WTA), en donde el anticuerpo monoclonal anti-ácidos teicoicos de pared se une a *Staphylococcus aureus* y se fija covalentemente a un antibiótico de tipo rifamicina mediante un enlazador peptídico (L) escindible por endopeptidasas o cisteína proteasas de *S. aureus*, el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico se selecciona de las fórmulas:



10 en la que

R^5 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y
n es 0 o 1; y



15 en la que

R^3 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} ; y
n es 1 o 2;
en donde R es H, alquilo C_1 - C_{12} o $C(O)CH_3$;
L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:



25 en la que Str es una unidad extensora, Pep es un péptido de dos a doce restos de aminoácidos e Y es una unidad espaciadora;
Ac es el anticuerpo monoclonal anti-ácidos teicoicos de pared; y
p es un número entero de 1 a 8;
en donde la VL del anticuerpo monoclonal anti-WTA comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO: 100) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); y la VH del anticuerpo monoclonal anti-WTA comprende CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103) y CDR H3 que comprende la secuencia de GEGGLDD (SEQ ID NO: 118) o GDGGLDD (SEQ ID NO: 104).

- 35 2. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una VL

que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 119.

3. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 156.

5 4. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo comprende una VL y una VH, en donde la VL comprende la secuencia de SEQ ID NO: 119 y la VH comprende la secuencia SEQ ID NO: 156.

10 5. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124.

15 6. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124.

20 7. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 124.

25 8. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 120.

30 9. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8, en donde el anticuerpo comprende una VL y una VH, en donde la VL comprende la secuencia de SEQ ID NO: 119 y la VH comprende la secuencia SEQ ID NO: 120.

35 10. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 121 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 146.

11. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

40 12. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 157.

45 13. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena ligera (LC) en donde la LC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 145 y una cadena pesada (HC) en donde la HC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

50 14. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el antibiótico de tipo rifamicina comprende una amina cuaternaria fijada al enlazador peptídico.

15. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 14, en donde el enlazador peptídico está fijado a una cisteína o una cisteína modificada por ingeniería del anticuerpo anti-WTA.

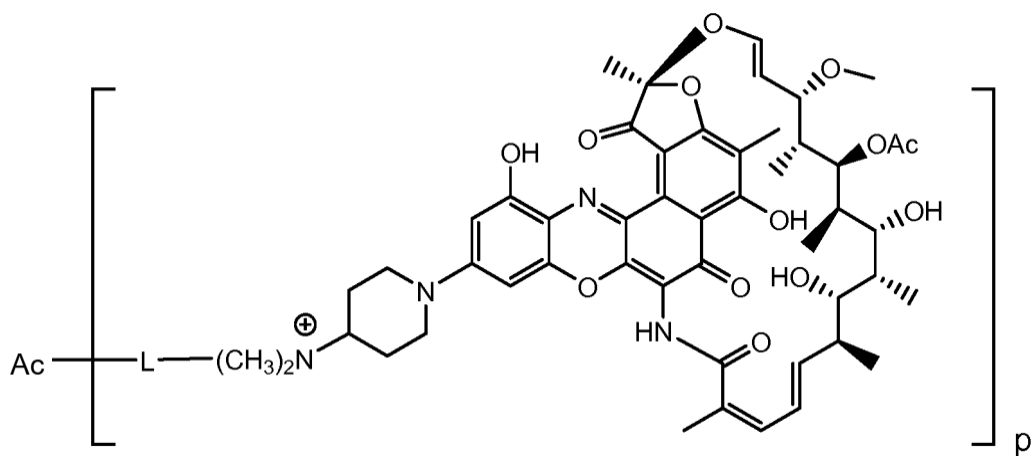
55 16. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, en donde el enlazador peptídico es un enlazador escindible por estafopaina B o por estafopaina A.

17. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 16, en donde el enlazador peptídico es un enlazador escindible por la proteasa cathepsina B humana.

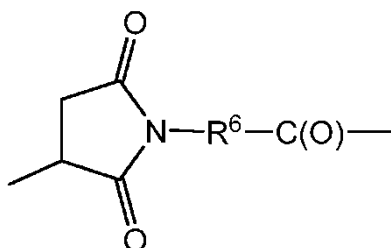
60 18. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 17, en donde el enlazador peptídico es un enlazador dipeptídico val-cit.

65 19. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde p es de 2 a 4.

20. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1, que tiene la fórmula:



21. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde Str tiene la fórmula:



- en la que R^6 se selecciona del grupo que consiste en alquileo C_1-C_{10} , -carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arileno-, -alquileo-arileno C_1-C_{10} , -arileno-alquileo- C_1-C_{10} , -alquileo C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo- C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, -heterociclo C_3-C_8 , -alquileo C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, -(CH₂CH₂O)_r y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía de 1 a 10.

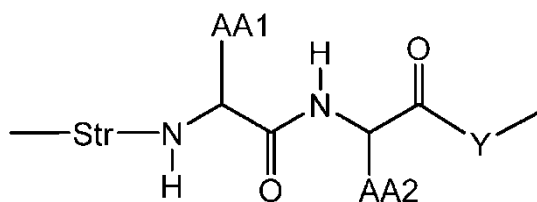
22. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 21, en donde R^6 es -(CH₂)₅-.

23. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde Pep comprende de dos a doce restos de aminoácidos seleccionados independientemente de glicina, alanina, fenilalanina, lisina, arginina, valina y citrulina.

24. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 23, en donde Pep se selecciona de valina-citrulina (val-cit, vc), fenilalanina-lisina (fk) y valina-citrulina-fenilalanina (val-cit-phe).

25. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde Y comprende paraaminobencilo o paraaminobenciloxycarbonilo.

26. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:



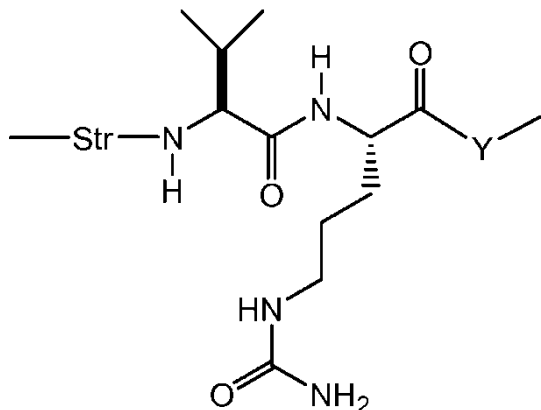
- donde AA1 y AA2 se seleccionan independientemente de una cadena lateral de aminoácidos.

27. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde la cadena lateral de aminoácidos se selecciona independientemente de H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$.

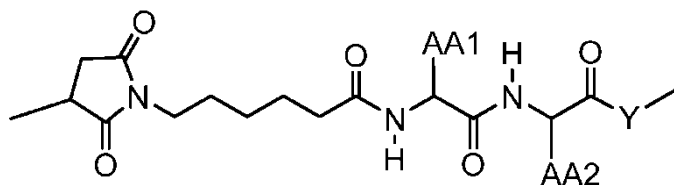
28. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

5



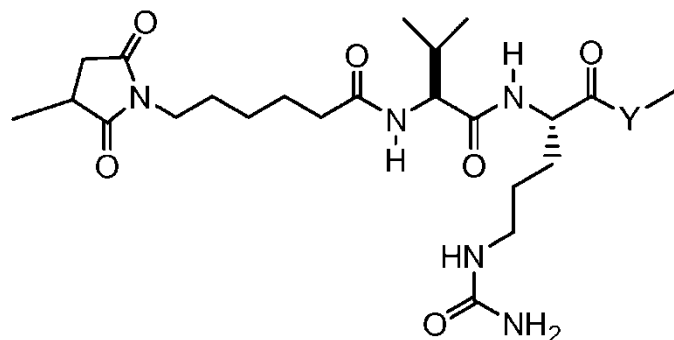
29. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

10



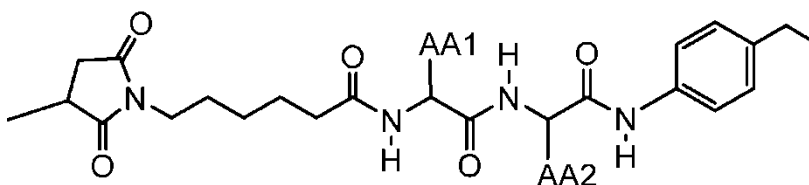
30. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 29, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

15



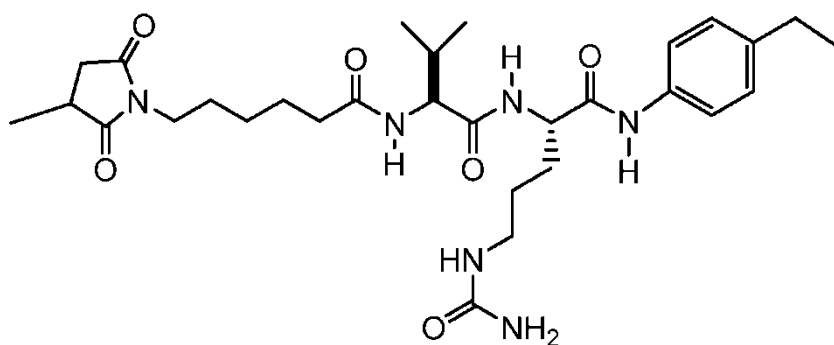
31. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

20



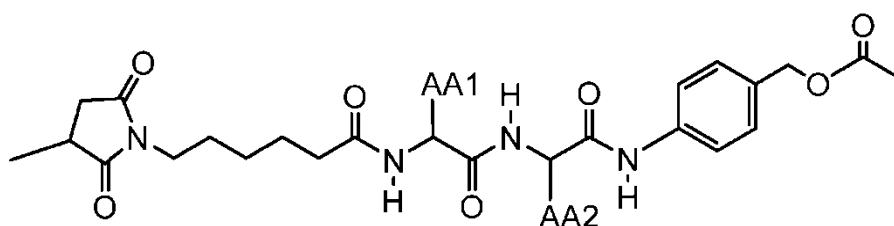
32. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 31, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

25



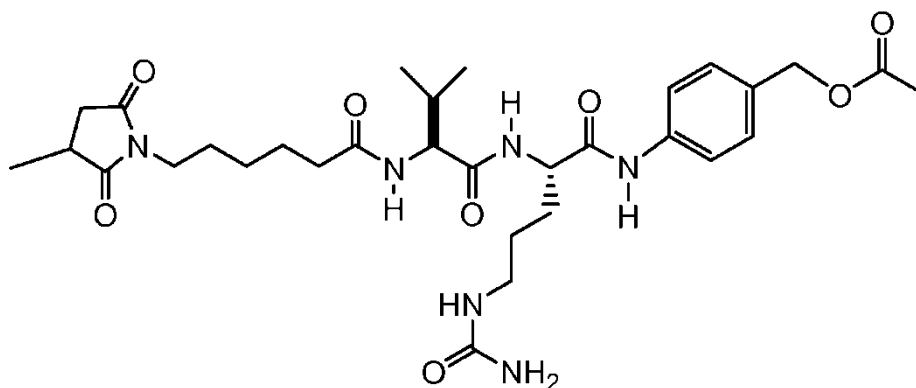
33. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

5



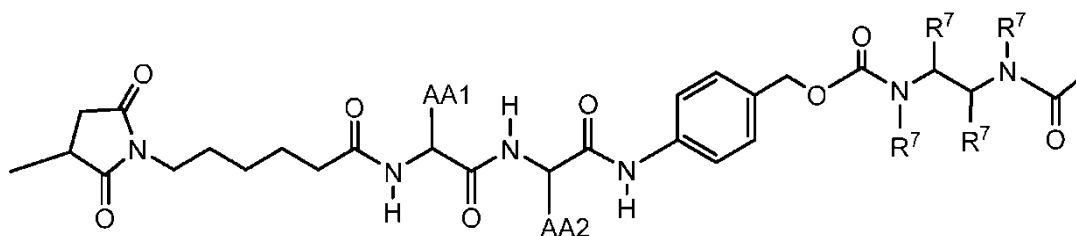
34. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 33, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

10



35. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26, en donde L es el enlazador peptídico que tiene la fórmula:

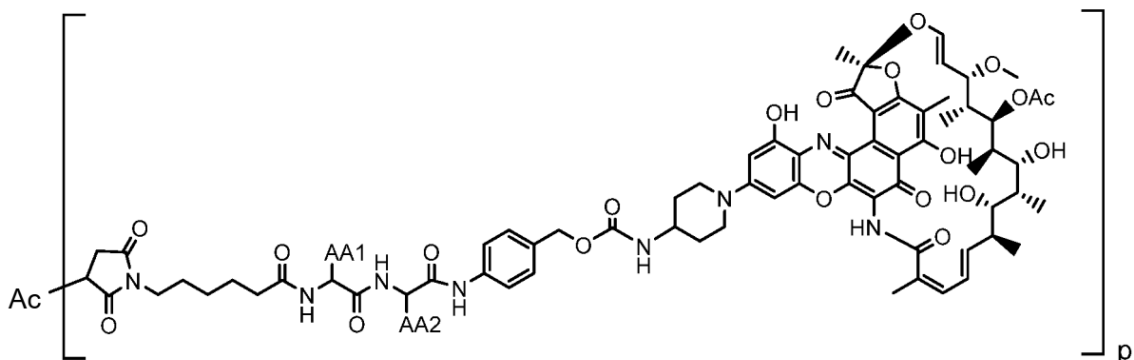
15



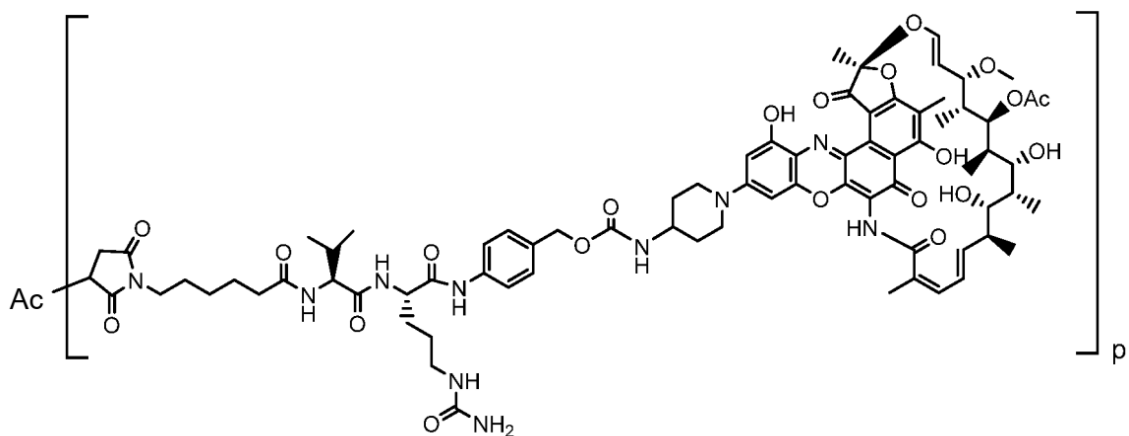
donde R^7 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1 - C_{12} .

36. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26 que tiene la fórmula:

20

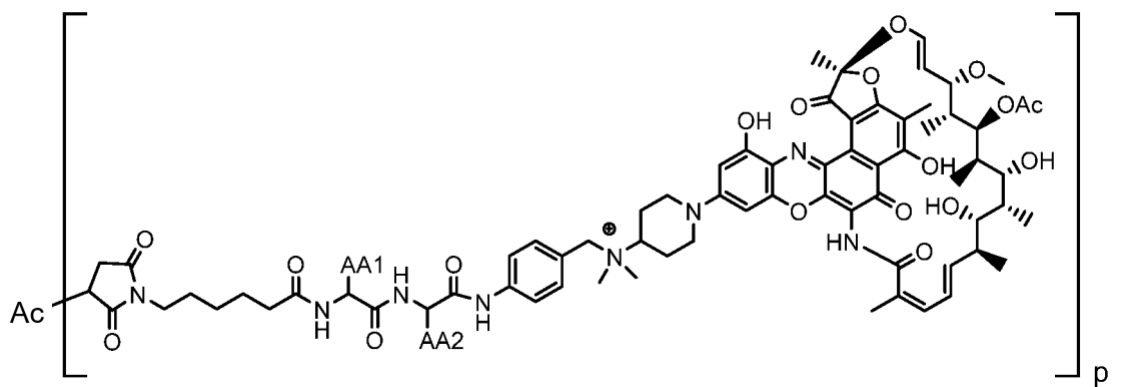


37. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 36 que tiene la fórmula:



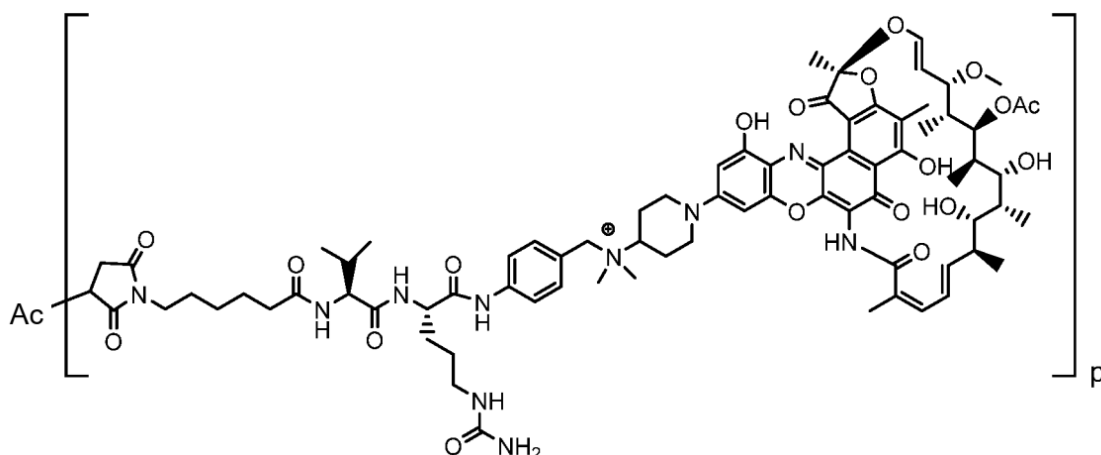
5

38. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 26 que tiene la fórmula:

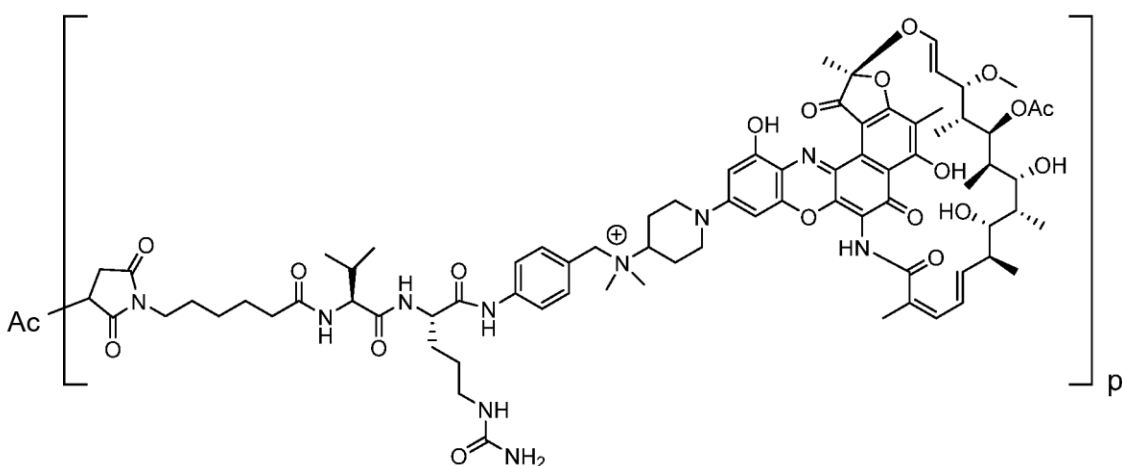


10

39. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 38 que tiene la fórmula:



40. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de la reivindicación 1 que tiene la fórmula:



5

en donde Ac es un anticuerpo monoclonal anti-ácidos teicoicos de pared (WTA) que se une a *Staphylococcus aureus*, en donde la VL del anticuerpo monoclonal anti-ácidos teicoicos de pared comprende CDR L1 que comprende la secuencia de KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2 que comprende la secuencia de WASTRKS (SEQ ID NO: 100) y CDR L3 que comprende la secuencia de QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); y la VH del anticuerpo monoclonal anti-WTA comprende CDR H1 que comprende la secuencia de SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2 que comprende la secuencia de FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103) y CDR H3 que comprende la secuencia de GEGGLDD (SEQ ID NO: 118); y p es un número entero de 1 a 8.

15

41. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo, un agente de deslizamiento, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

20

42. Un proceso para preparar el compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, que comprende conjugar el antibiótico de tipo rifamicina con el anticuerpo monoclonal de WTA.

25

43. Un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 para su uso en terapia.

44. Un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 para su uso en un método para tratar una infección bacteriana en un paciente, en donde la infección bacteriana es una infección por *Staphylococcus aureus*.

30

45. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de la reivindicación 44, en donde la carga bacteriana en el paciente se reduce por el tratamiento.

46. Un compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40 para su uso en

un método para reducir el número de células bacterianas intracelulares de *Staphylococcus aureus* en las células hospedadoras de un paciente infectado por *Staphylococcus aureus* sin reducir el número de las células hospedadoras.

47. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de la reivindicación 46, en donde se reduce el número de células bacterianas persistentes.

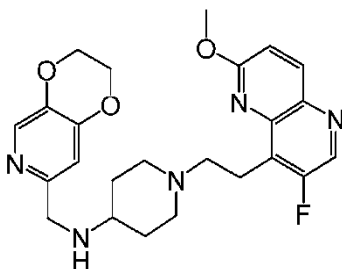
48. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 47, en donde el paciente es un ser humano.

49. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 44 a 48, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico.

50. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de la reivindicación 49, en donde el segundo agente terapéutico es un antibiótico.

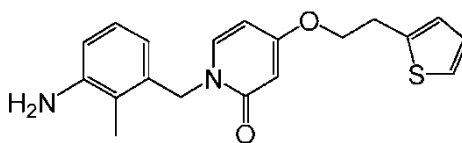
51. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de la reivindicación 50, en donde el segundo agente terapéutico es un antibiótico seleccionado de la clase estructural que consiste en (i) aminoglucósidos, (ii) betalactámicos, (iii) macrólidos/péptidos cíclicos, (iv) tetraciclinas, (v) fluoroquinolonas/fluoroquinolonas y (vi) oxazolidinonas.

52. El compuesto conjugado anticuerpo-antibiótico para su uso en el método de la reivindicación 50, en donde el segundo agente terapéutico es un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en clindamicina, novobiocina, retapamulina, daptomicina, GSK-2140944 (gepotidacina) que tiene la estructura:



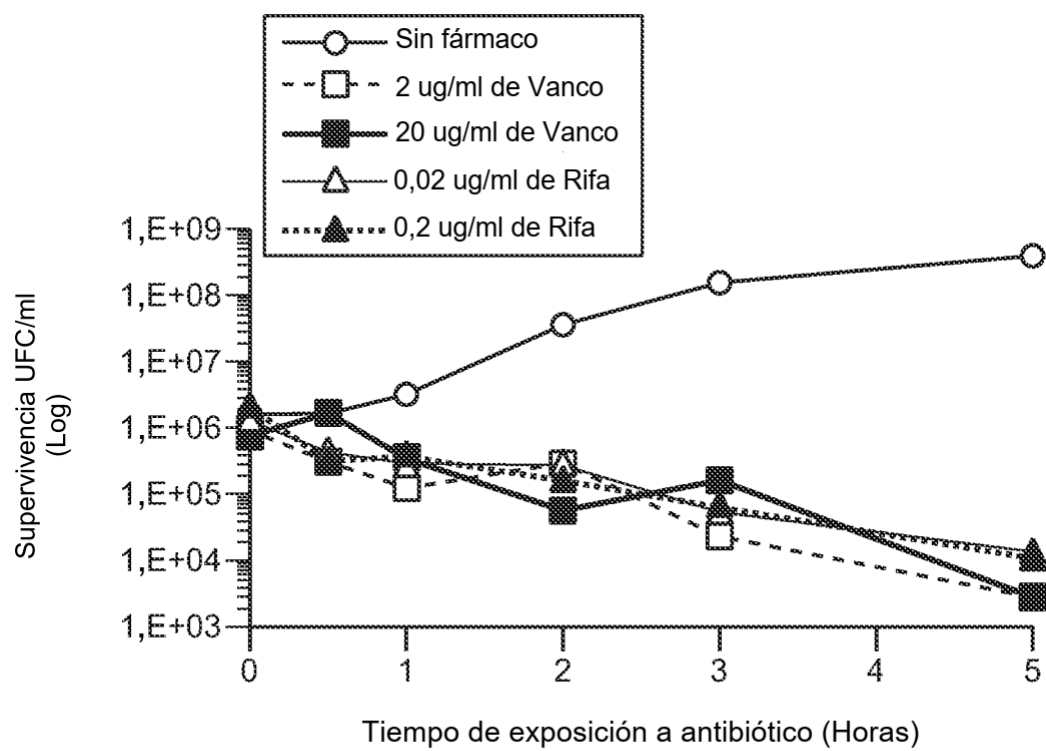
GSK-2140944 ,

CG-400549 que tiene la estructura:



CG-400549 ,

sitafloracina, teicoplanina, triclosán, naftiridona, radezolida, doxorubicina, ampicilina, vancomicina, imipenem, doripenem, gemcitabina, dalbavancina y azitromicina.

**FIG. 1**

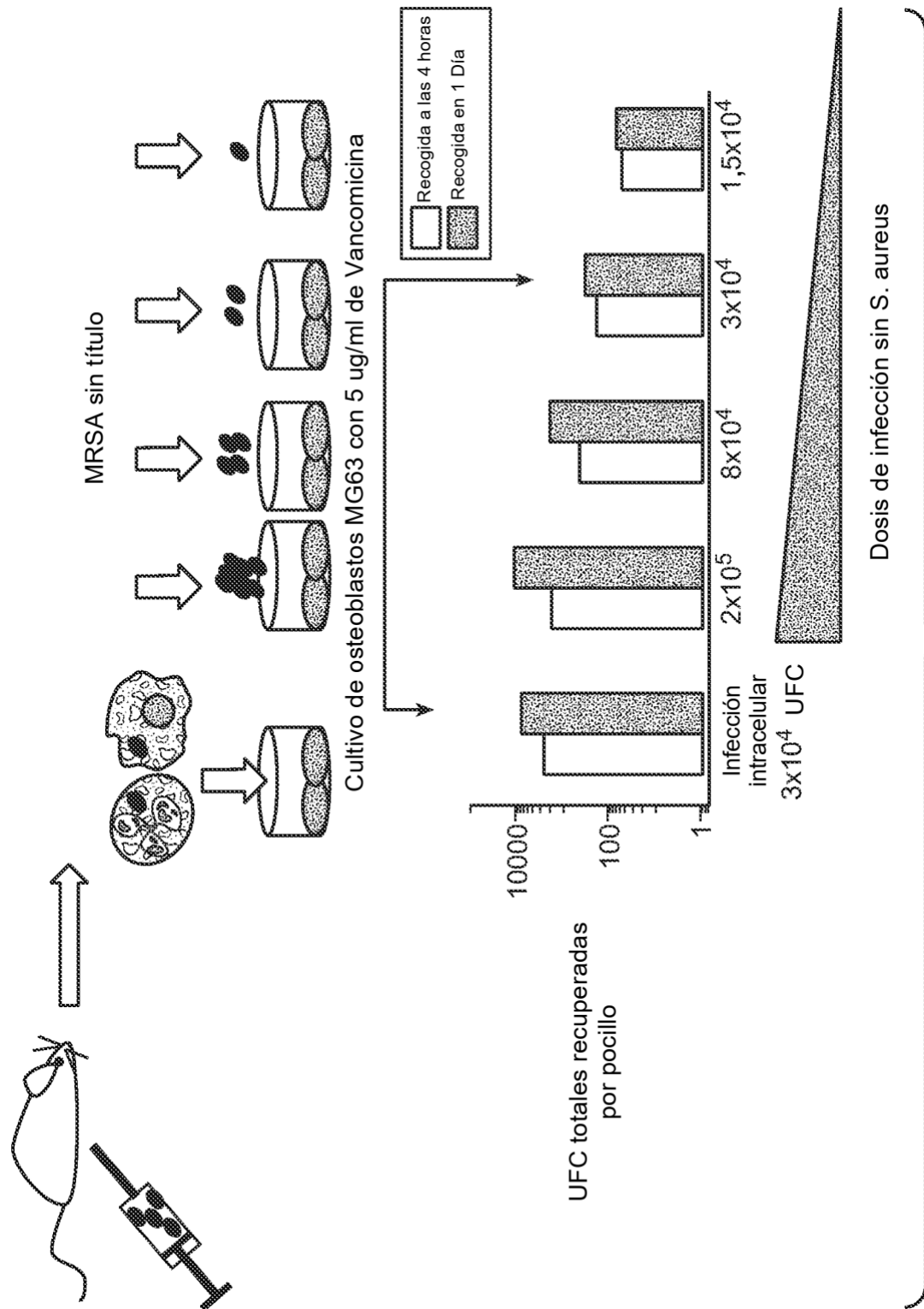
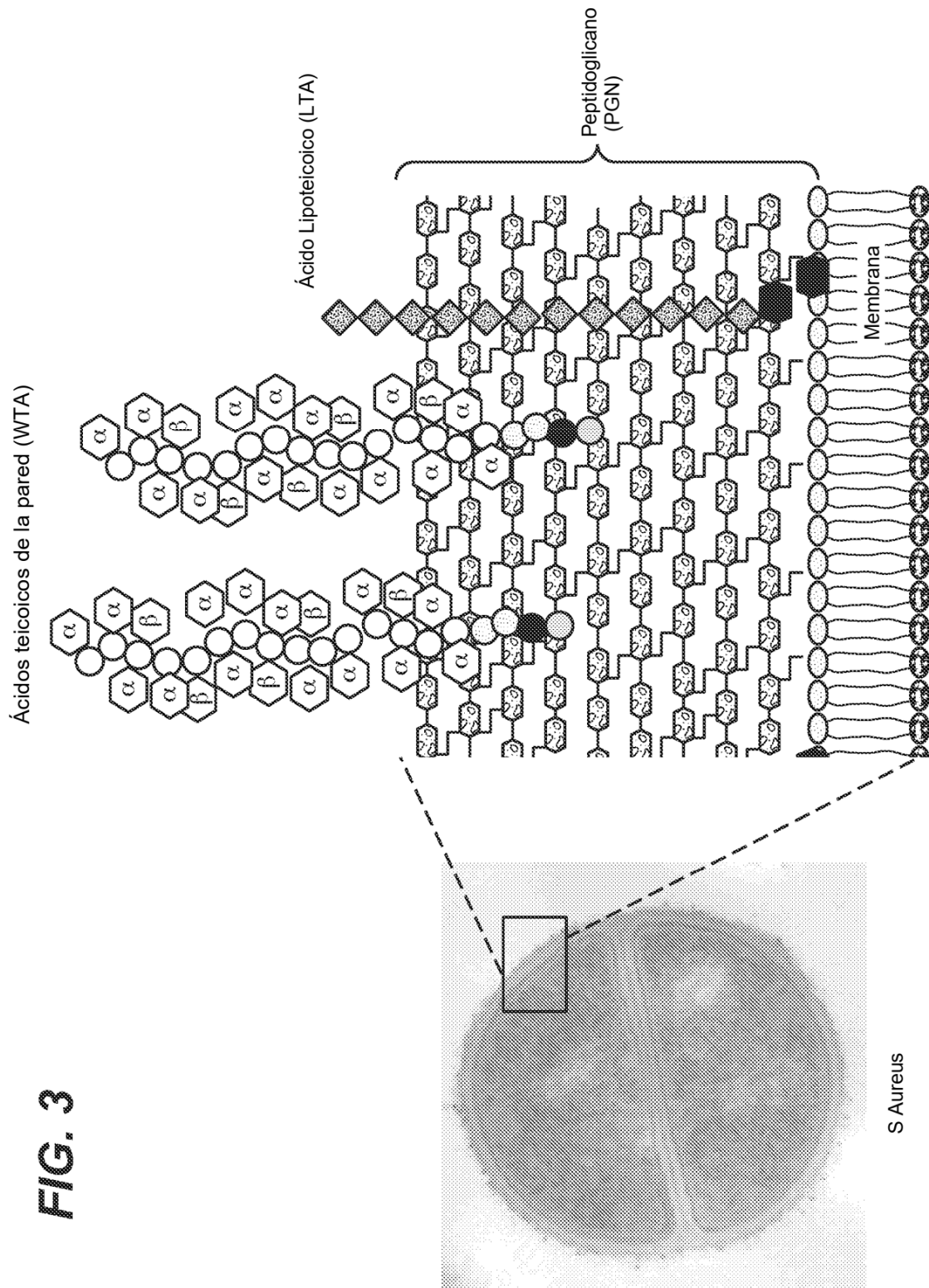


FIG. 2



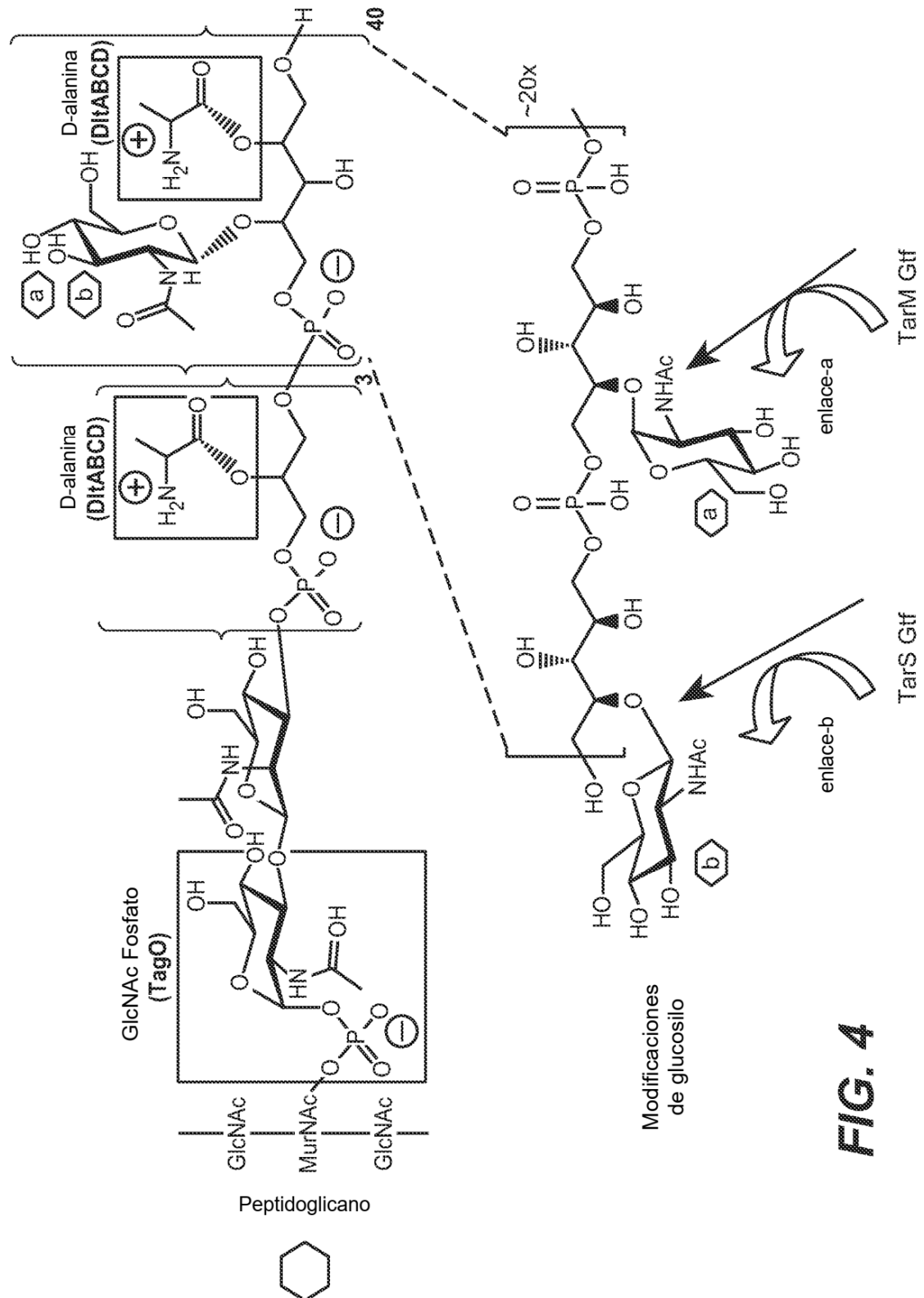


FIG. 4

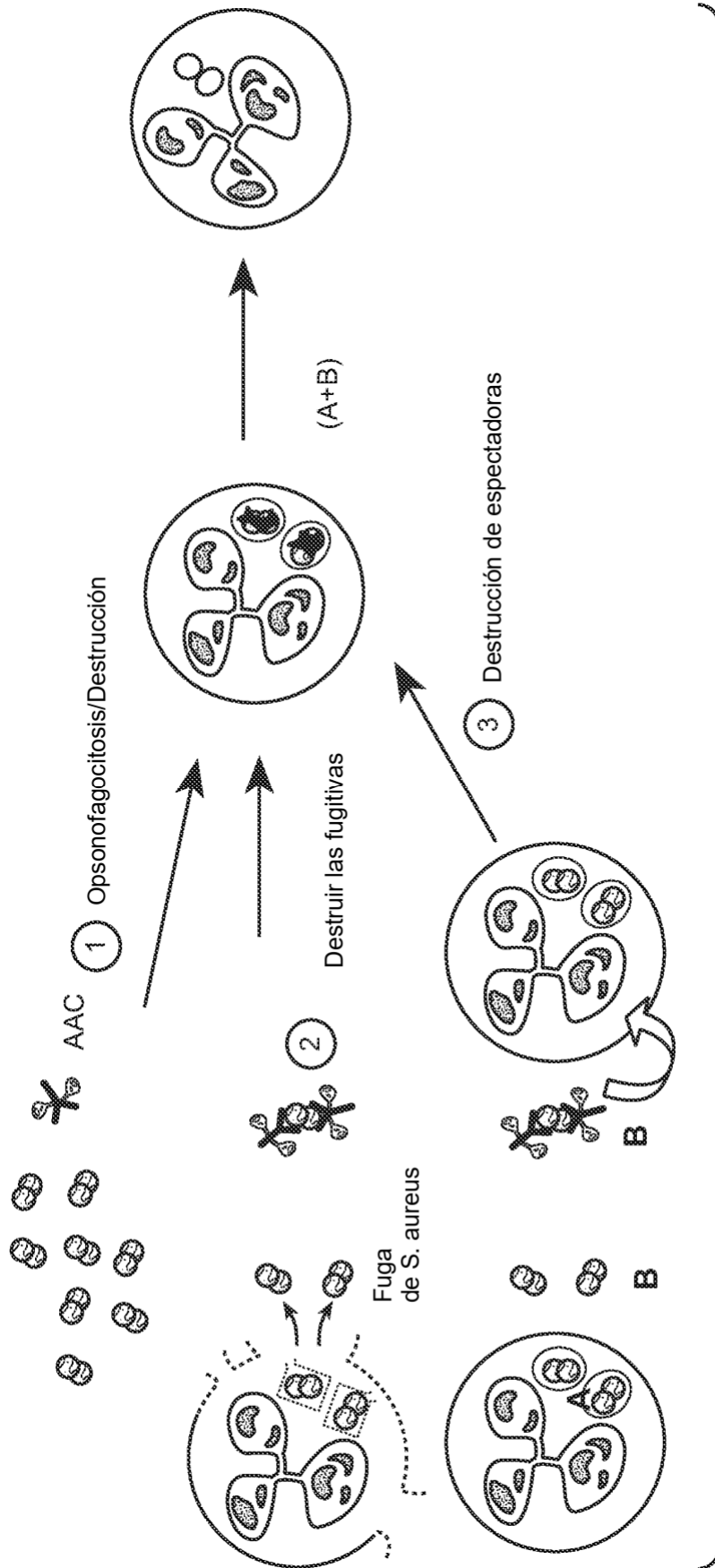


FIG. 5

FIG. 6

FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6A

Anticuerpo	Antígeno	GlcNAc	KD(nM)	Densidad de antígenos. Sitios promedio Bacteria	Donante	Células fuente	Unión a los Recubrimientos en Ac de primera exploración (ELISA)
4497	WTA	beta	2,5	50	327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4462	WTA	beta	3,1	43	326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4450	WTA	beta			326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4487	WTA	beta			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6078	WTA	beta			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6263	WTA	beta	1,4	22.000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6297	WTA	beta	1,1	21.000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6239	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6292	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6232	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6259	WTA	beta			350	PB/PC	CW USA300 stat(agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6253	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6265	WTA	beta			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)

4461(7574)	WTA	alfa			326	sMBC	CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4624(7578)	WTA	alfa	0,4	16	326	sMBC	CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4399	WTA	alfa			326	sMBC	CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6267	WTA	alfa			350	PB/PC	CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
rF1	proteínas SDR	?	0,3	1600			
4516(7577)	proteínas SDR	?			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6234	proteínas SDR	?			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
6060	proteínas SDR	?			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)
4569	LTA	?			327	PB/PC	CW Wood46 stat TSB
4479	PGN				327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat (agot. de hierro :TBS en relación 96:4)

FIG. 6B

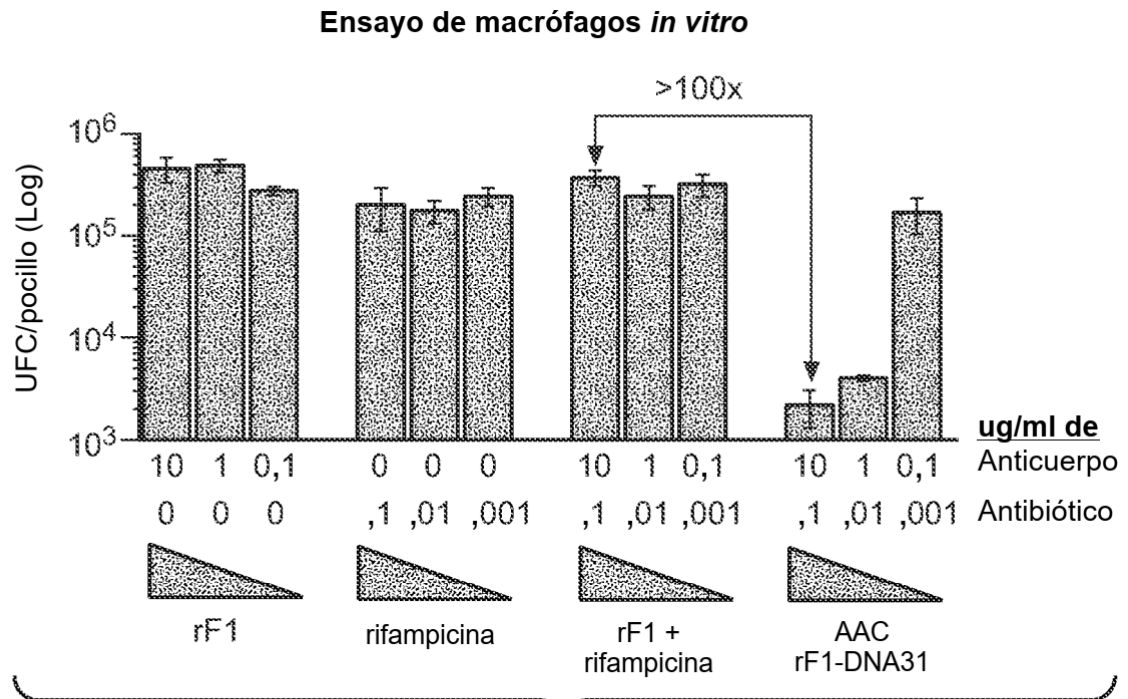


FIG. 7A

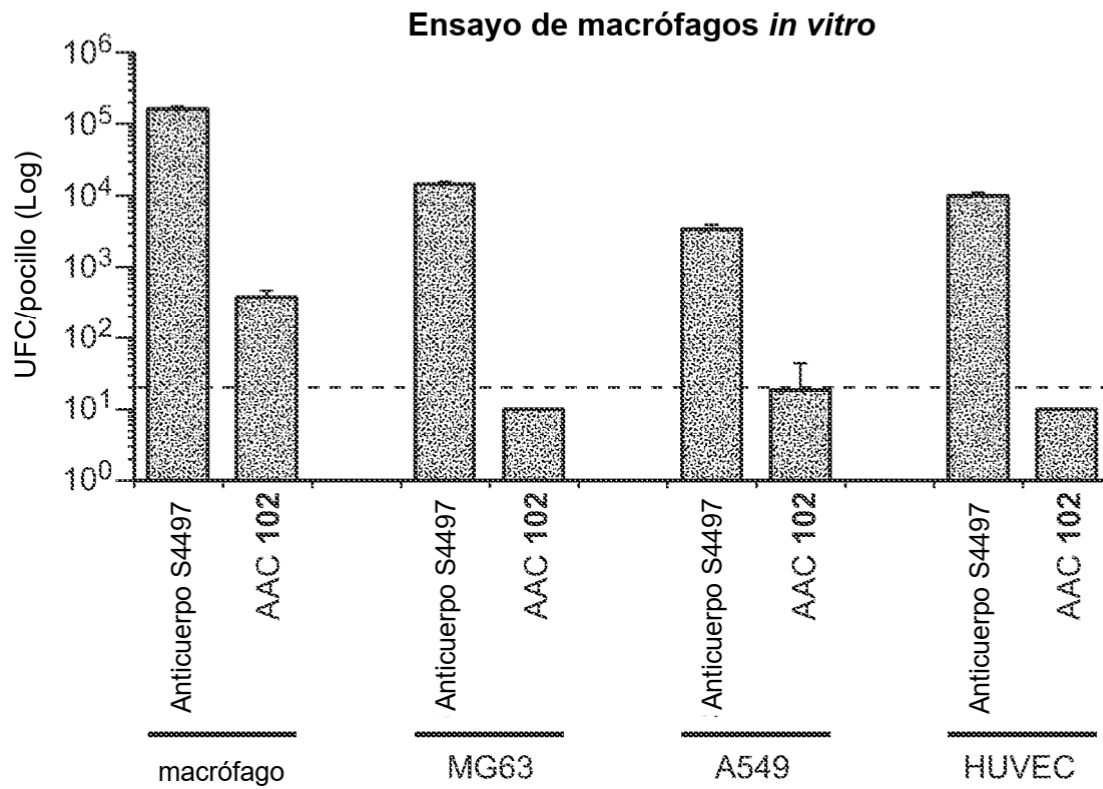


FIG. 7B

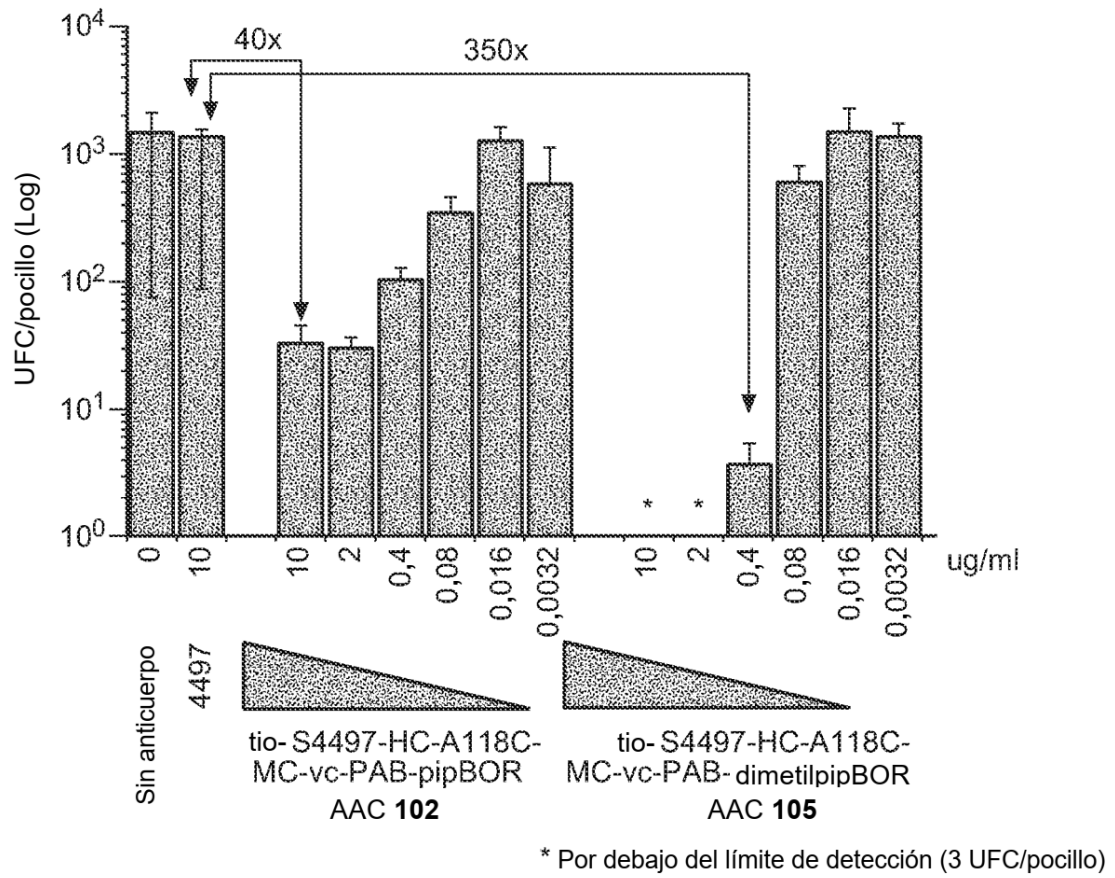


FIG. 7C

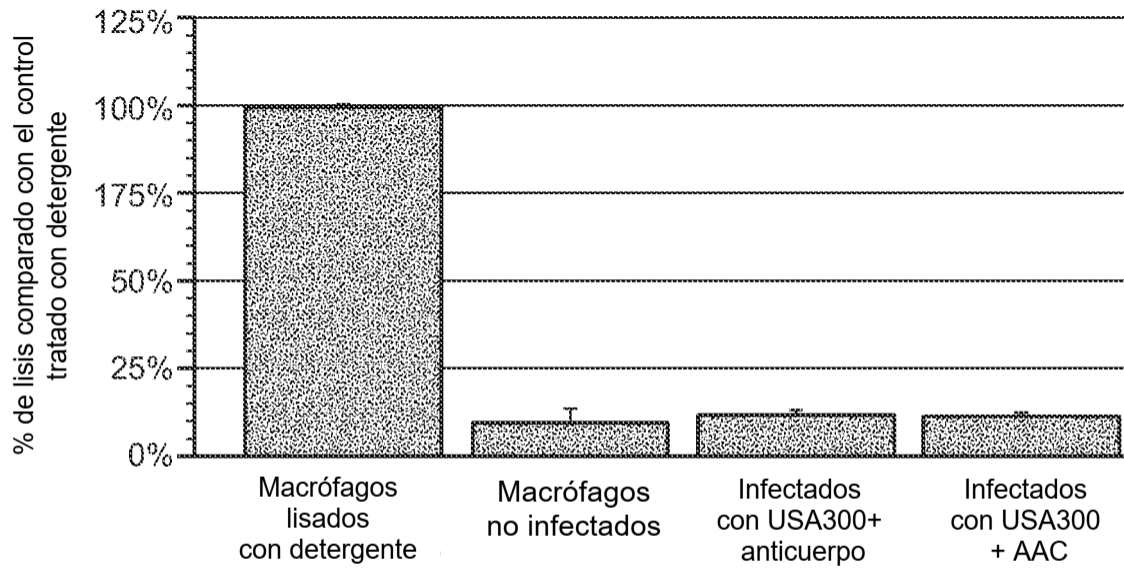


FIG. 7D

Recuperación de *S. aureus* vivas del interior de los Macrófagos

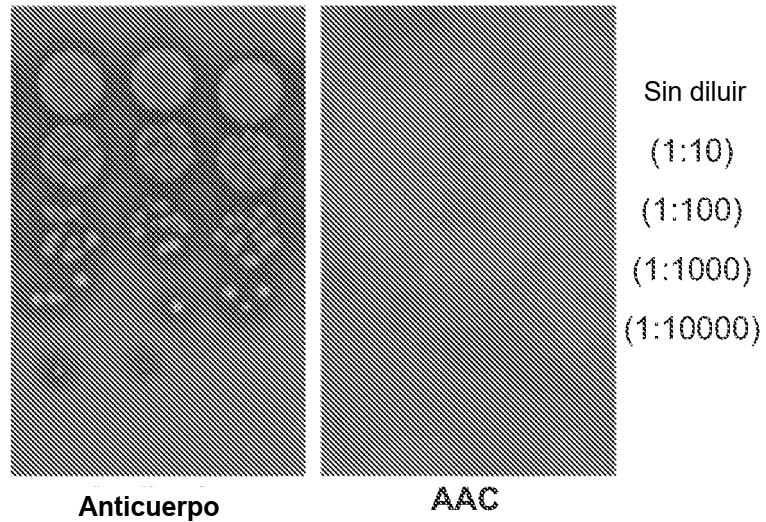
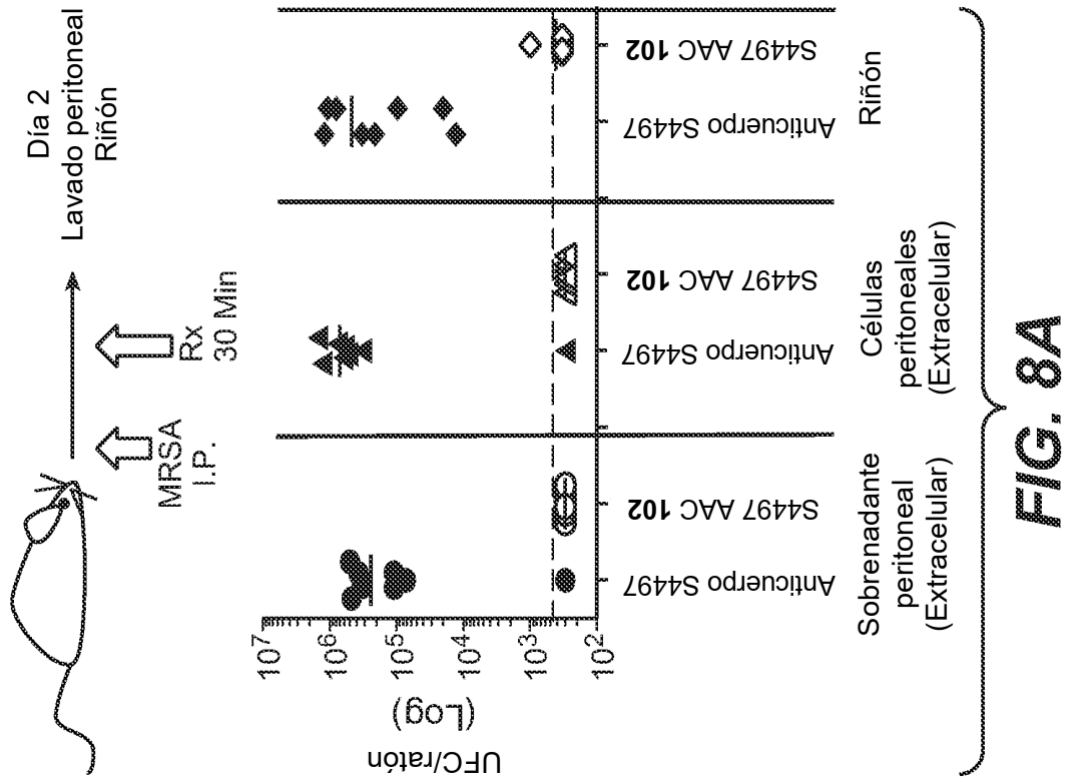
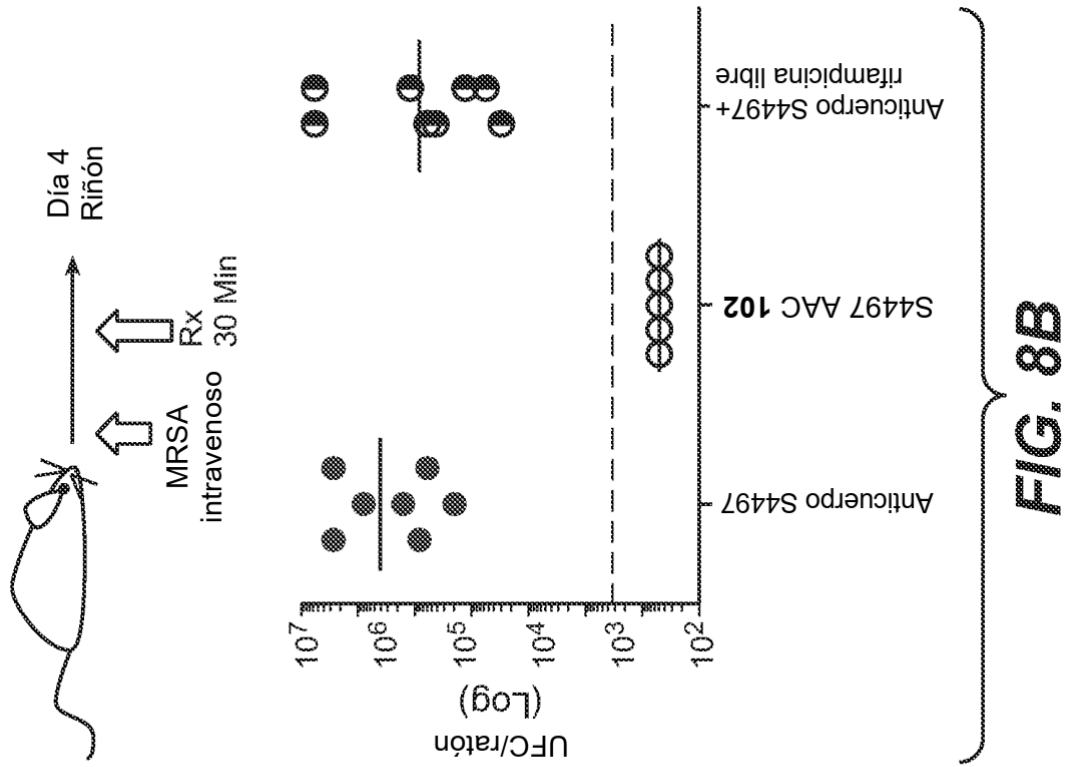


FIG. 7E





valores de p a partir del Test de Mann-Whitney contra el Grupo de 1mg de 4497

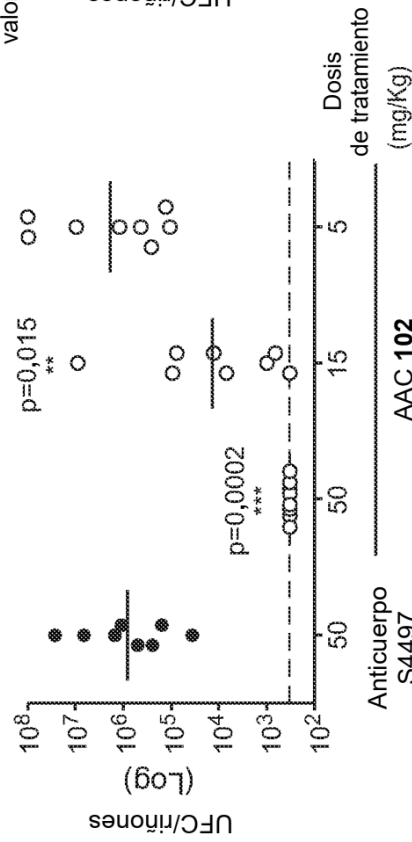


FIG. 9A

valores de p a partir del Test de Mann-Whitney con el Grupo de 2000 ug de 4497

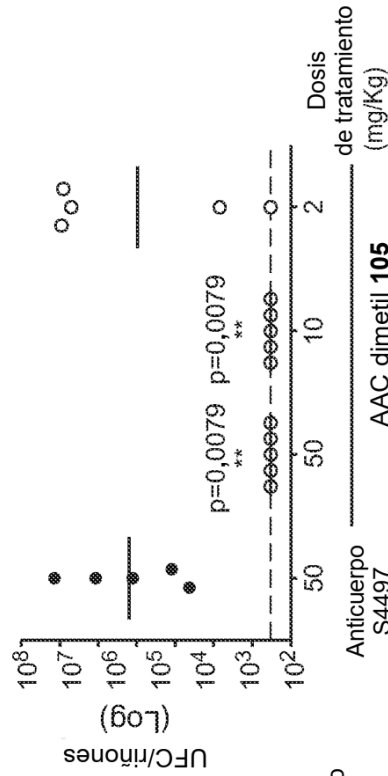
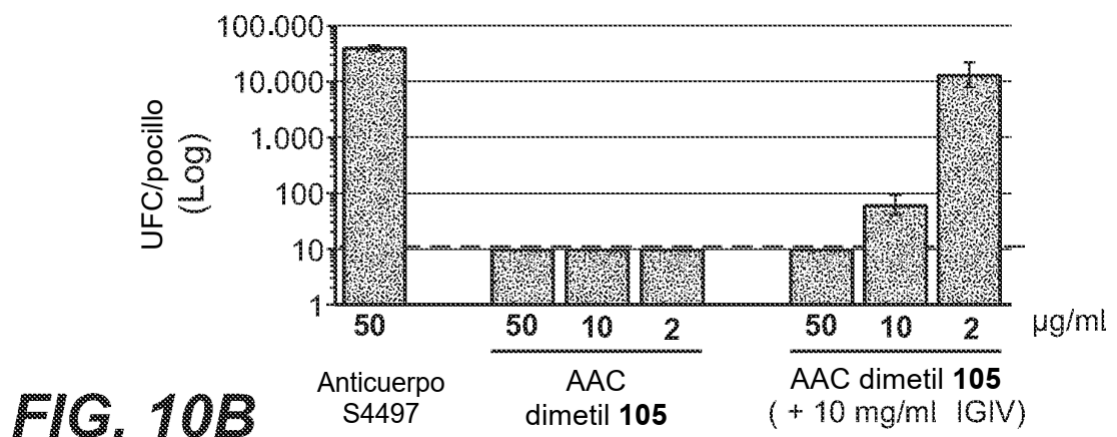
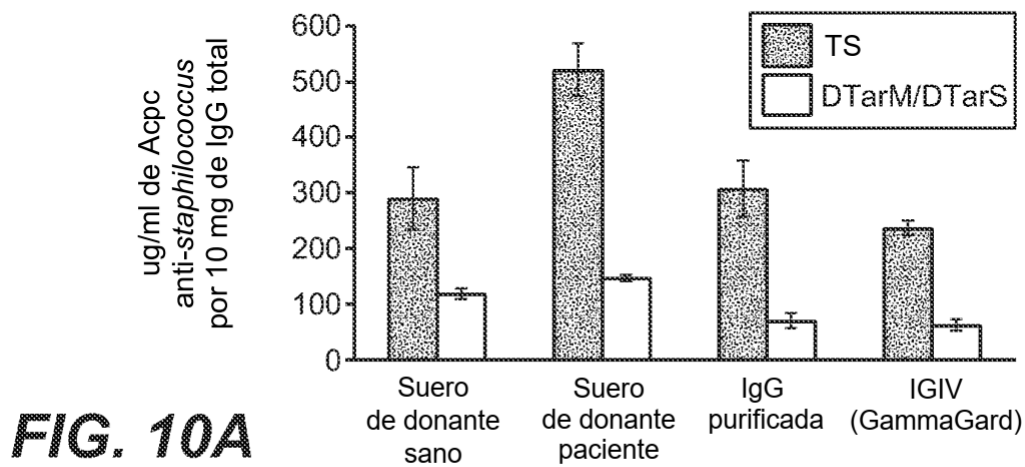
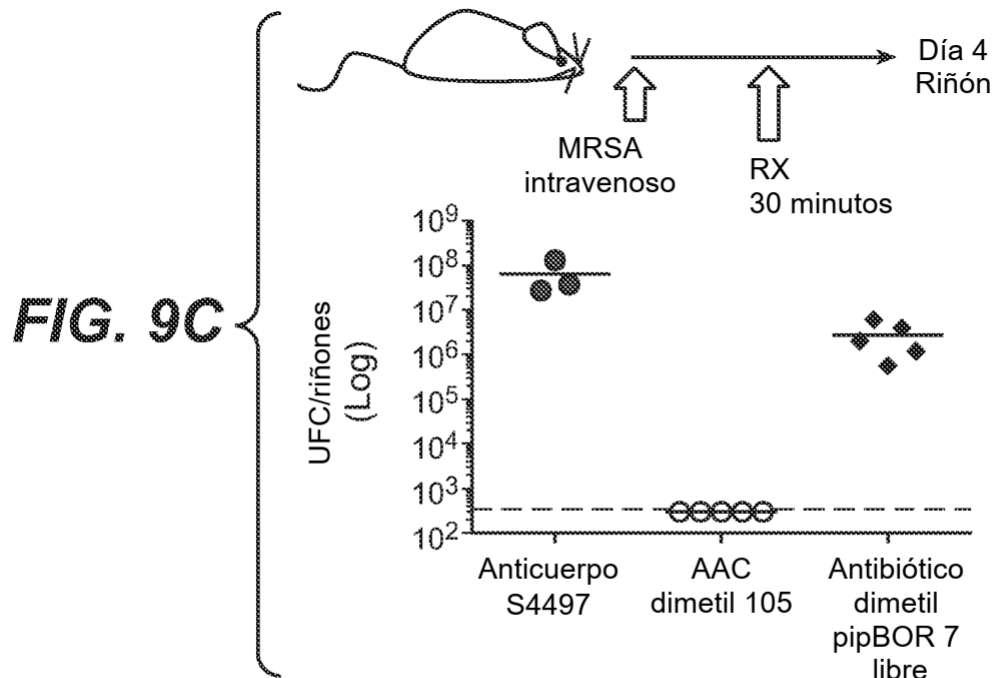
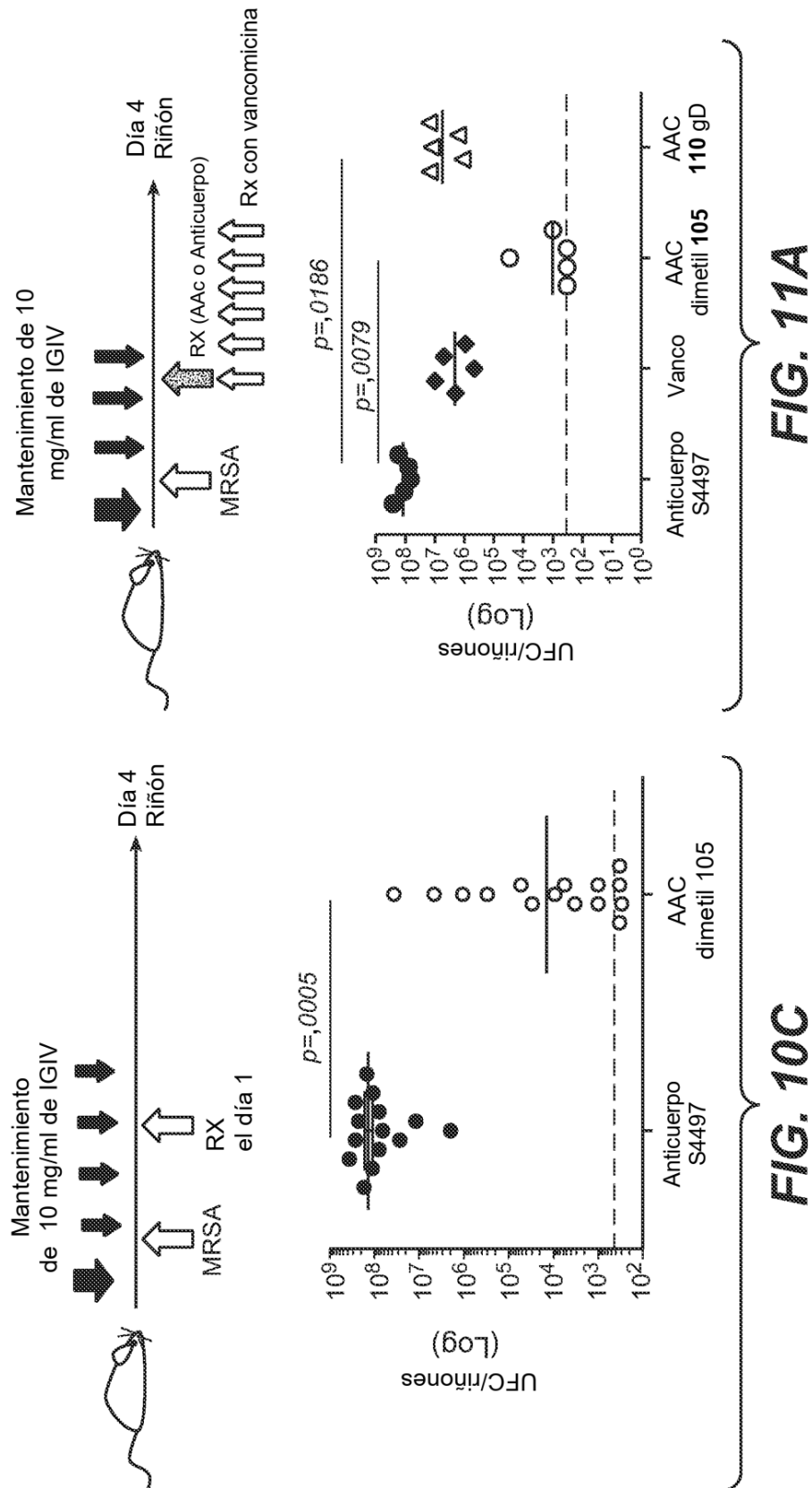


FIG. 9B





**Unión de anticuerpos anti-*staphilococcus*
a USA300 de los riñones (IV en el día 3)**

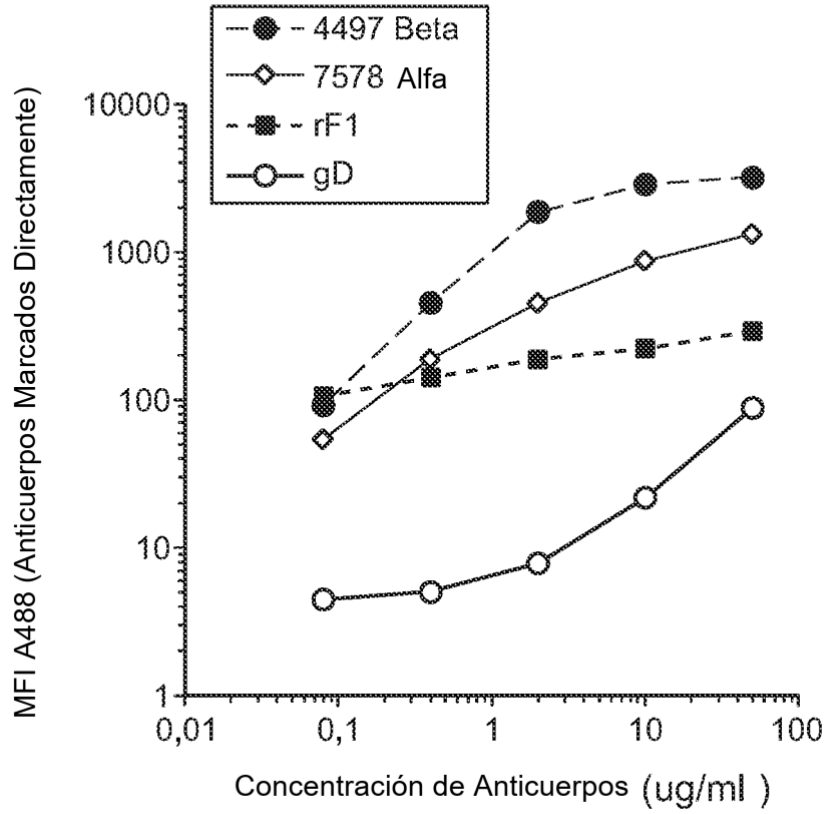


FIG. 11B

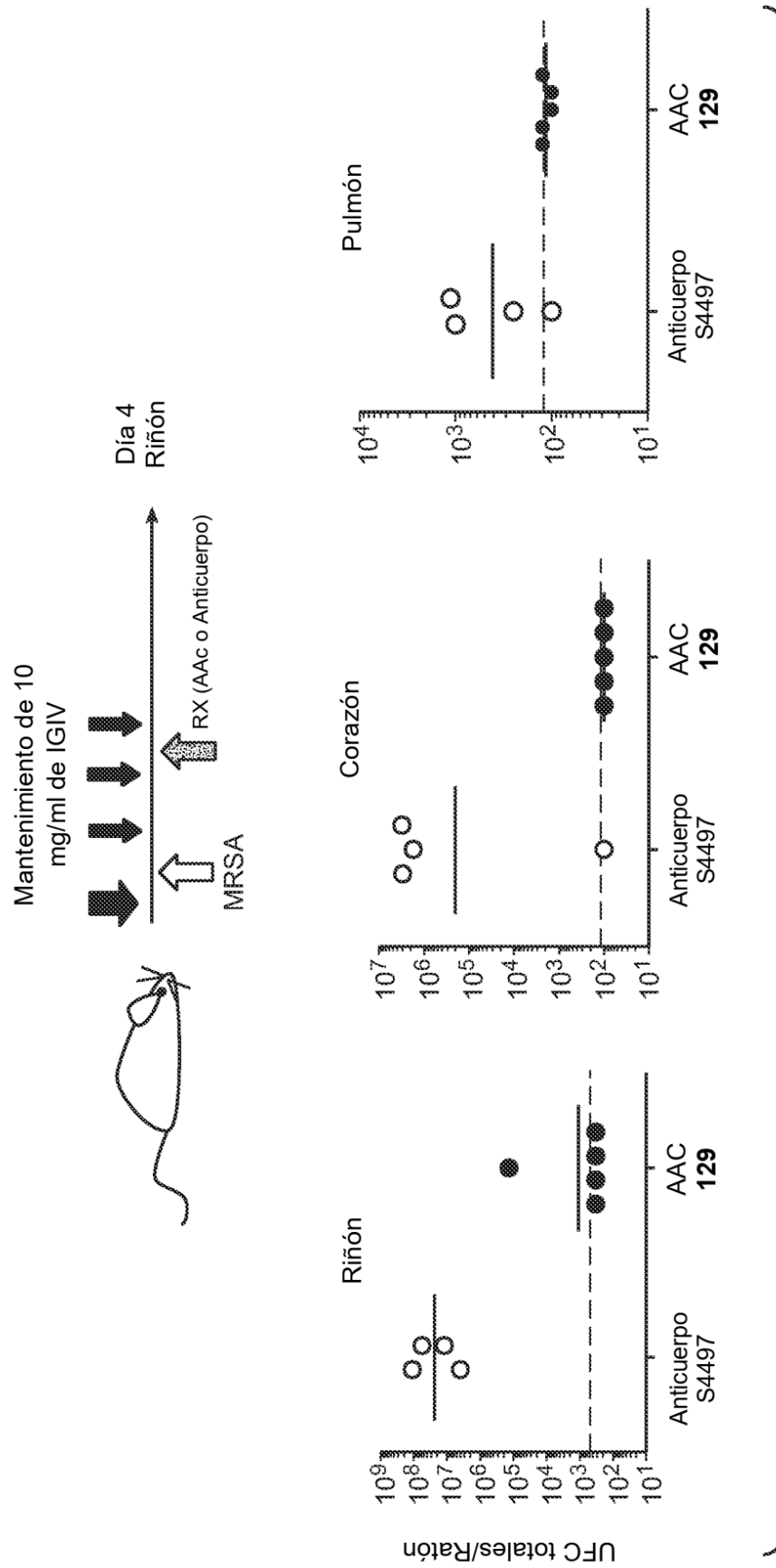


FIG. 11C

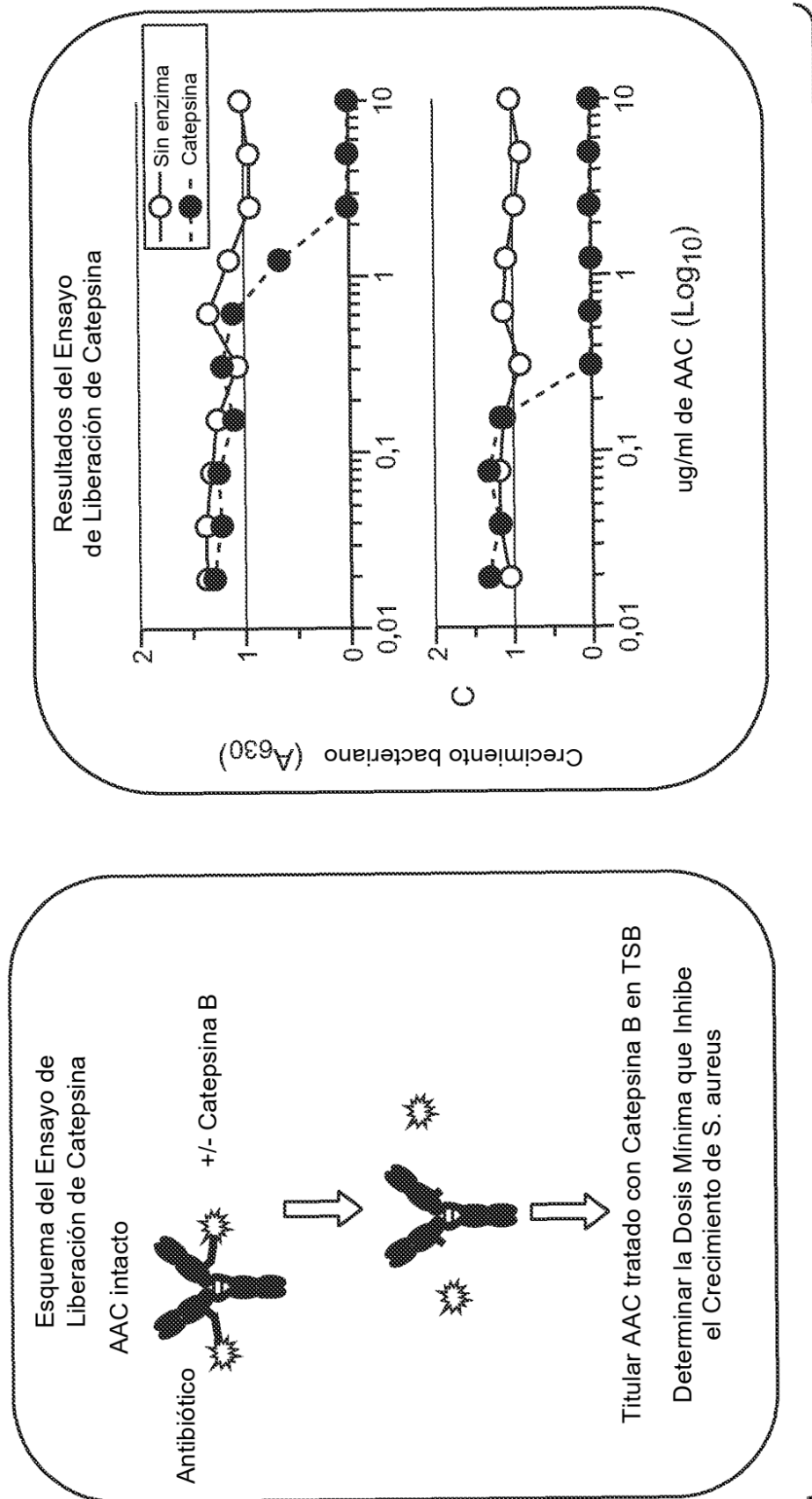


FIG. 12

Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4461	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	S	R	A	N	N	N	Y	Y	V	A	W	Y
4624	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	N	Q	N	L	-	S	S	S	N	N	N	Y	L	A	W	Y	
4399	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	N	Q	N	V	L	A	S	S	N	D	K	N	Y	L	A	W	F
6267	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	N	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	W	Y

Número de Kabat	37	38	39	40	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	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
4461	Q	H	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	F	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	N	S	L
4624	Q	Q	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
4399	Q	H	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
6267	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L

Número de Kabat	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
4461	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4624	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4399	R	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	F	N
6267	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I

FIG. 13A

Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat están subrayadas
Región Variable de Cadena Pesada

Número de Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
4461	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	R	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	
4624	Q	V	Q	L	Q	Q	S	R	V	E	V	K	R	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	T	S	G	Y	T	F	S	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G	
4399	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G	
6267	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W	V	R	Q	M	P	G	
										CDRL H2 de contacto																																	
										CDRL H2-Choithia										CDRL H2-Kabat																							
Número de Kabat	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	
4461	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	P	K	S	G	G	T	N	Y	A	Q	R	F	Q	G	R	V	T	M	T	G	D	T	S	I	S	A	A	Y	M	D	L	A	
4624	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	Y	A	Q	K	F	R	D	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	L	E	M	S		
4399	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	M	E	L	S	
6267	K	G	L	E	W	M	G	I	I	H	P	G	D	S	K	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	N	
										CDRL H3 de contacto																																	
										CDRL H3-Choithia										CDRL H3-Kabat																							
Número de Kabat	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	109h	100i	100j	100k	100l	100m	100n	100o	100p	100q	100r	100s	100t	100u	101	
4461	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	V	K	D	C	G	S	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D
4624	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	R	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	
4399	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	N	A	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	
6267	S	L	K	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	L	Y	C	S	G	G	S	C	Y	S	D	R	A	F	S	S	S	L	G	A	G	C	Y	Y	Y	G	M	G	
Número de Kabat	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113																															
4461	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																															
4624	I	W	G	P	G	T	M	V	T	V	S	S																															
4399	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																															
6267	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S																															

FIG. 13B

Anticuerpo	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
6078	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:33)	KASTLES (SEQ ID NO:34)	QQKYSFN (SEQ ID NO:35)	SYDIN (SEQ ID NO:36)	WMNANSNGTGYAQKFQG (SEQ ID NO:37)	SSLVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:38)
6263	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:39)	KASTLES (SEQ ID NO:40)	QQKYSFN (SEQ ID NO:41)	SYDIN (SEQ ID NO:42)	WMNANSNGTGYAQKFQG (SEQ ID NO:43)	SSLVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:44)
4450	RASQFVSRISLA (SEQ ID NO:45)	ETSSRAT (SEQ ID NO:46)	HKYGSGPRT (SEQ ID NO:47)	NYDFI (SEQ ID NO:48)	WMNPNSYNTGYGQKFQG (SEQ ID NO:49)	AVRGQLLSEY (SEQ ID NO:50)
6297	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:51)	DASSRAT (SEQ ID NO:52)	QKYGSTPRP (SEQ ID NO:53)	SYDIN (SEQ ID NO:54)	WMNPNSNGTNYAQRFGG (SEQ ID NO:55)	ERWSKDTGHYYYYGMDV (SEQ ID NO:56)
6239	RASLDITNHLA (SEQ ID NO:57)	EASILQS (SEQ ID NO:58)	EKCNSPTPT (SEQ ID NO:59)	NYDIN (SEQ ID NO:60)	WMNPSSSGRTGYAPKFRG (SEQ ID NO:61)	GGGYDSSGNYHISGLDV (SEQ ID NO:62)
6232	RASQSVGAIYLA (SEQ ID NO:63)	GVSNRAT (SEQ ID NO:64)	QLYTSSRALT (SEQ ID NO:65)	AYAMN (SEQ ID NO:66)	SITKNSDSLYYADSVKG (SEQ ID NO:67)	LAARIMATDY (SEQ ID NO:68)
6259	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:69)	PASTLES (SEQ ID NO:70)	LQDHNYPPT (SEQ ID NO:71)	YYSMI (SEQ ID NO:72)	SIDSSSRYYADSVKG (SEQ ID NO:73)	DGDDILSVYRGSGRPFYD (SEQ ID NO:74)
6292	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:75)	PASTLES (SEQ ID NO:76)	LQDHNYPPT (SEQ ID NO:77)	YYSMI (SEQ ID NO:78)	SIDSSSRYYTDSVKG (SEQ ID NO:79)	DGDDILSVYQGSGRPFYD (SEQ ID NO:80)
4462	RASQSVRTNVA (SEQ ID NO:81)	GASTRAS (SEQ ID NO:82)	LQYNTWPT (SEQ ID NO:83)	TNDMS (SEQ ID NO:84)	TIIGIDDTTHYADSVRG (SEQ ID NO:85)	NSGIYSF (SEQ ID NO:86)
6265	RASQDIGSSLA (SEQ ID NO:87)	ATSTLQS (SEQ ID NO:88)	QQLNNYVHS (SEQ ID NO:89)	DYAMG (SEQ ID NO:90)	VVTGHSYRTHYADSVKG (SEQ ID NO:91)	RIWSYGDDSFYD (SEQ ID NO:92)
6253	RASQSIGDRLA (SEQ ID NO:93)	WASNLEG (SEQ ID NO:94)	QQYKSQWS (SEQ ID NO:95)	SYAMN (SEQ ID NO:96)	YISSIETIYADSVKG (SEQ ID NO:97)	DRLVDVPLSSPNS (SEQ ID NO:98)
4497	KSSQSFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99)	WASTRKS (SEQ ID NO:100)	QQYFSPPT (SEQ ID NO:101)	SFWMH (SEQ ID NO:102)	FTNNEGTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103)	GDGGLDD (SEQ ID NO:104)
4487	RASQFTNHLYN (SEQ ID NO:105)	VASNLOS (SEQ ID NO:106)	QQSYRTPYT (SEQ ID NO:107)	SGYIN (SEQ ID NO:108)	YILSGAHTDIKASLGS (SEQ ID NO:109)	SGVYSKYSLDV (SEQ ID NO:110)

6263 tiene las mismas secuencias de CDR que 6078

FIG. 14

Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat están subrayadas

Cadena Ligera

Cadena Ligera

Número de Kabat	CDR L1 de contacto																																									
	CDR L1-Choithia																																									
	CDR L1-Kabat																																									
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HCLC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E

Número de Kabat	CDR L2 de contacto																																									
	CDR L2-Choithia																																									
	CDR L2-Kabat																																									
6078	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G

Número de Kabat	CDR L3 de contacto																																									
	CDR L3-Choithia																																									
	CDR L3-Kabat																																									
6078	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K	
6078.v2HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K	
6078.v2LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K	

Región constante, numeración EU

85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	S	D	E	Q	L	K

FIG. 15A-1

Número de Kabat	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078.v3HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v3LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HCLC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
Número EU	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
6078	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HCLC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
Número EU	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
6078	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v3HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v3LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v4HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v4LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v4HCLC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
Número EU	211	212	213	214																																						
6078	R	G	E	C																																						
6078.v2HC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v2LC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v3HC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v3LC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v4HC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v4LC-Cys	R	G	E	C																																						
6078.v4HCLC-Cys	R	G	E	C																																						

FIG. 15A-2

Cadena Pesada

Número de Kabat	CDR H1 de contacto										CDR H1-Kabat																																
	CDR H1-Choithia										CDR H1-Kabat																																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
6078	Q	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v2HC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v2LC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v3HC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v3LC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v4HC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v4LC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	
6078.v4HCLC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G	

Número de Kabat	CDR H2 de contacto										CDR H2-Kabat																															
	CDR H2-Choithia										CDR H2-Kabat																															
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
6078	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HCLC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S

FIG. 15B-1

		CDR H3 de contacto		CDR H3-Choithia		CDR H3-Kabat		Cons.																																				
Número de Kabat		82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118	119	
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v2HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v2LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v3HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v3LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v4HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v4LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v4HCLC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
Número EU		120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	
6078	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HCLC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	L	V	K	D	Y	F	P	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
Número EU		162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	
6078	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v2HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v2LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v3HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v3LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v4HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v4LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	
6078.v4HCLC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	S	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	

FIG. 15B-2

Número EU	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
6078	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4LC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HCLC-Cys	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
Número EU	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
6078	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HCLC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
Número EU	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
6078	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HCLC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P

FIG. 15B-3

Número EU	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	
6078	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
Número EU	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	
6078	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HCLC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
Número EU	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446										
6078	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v2HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v2LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v3HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v3LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v4HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v4LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										
6078.v4HCLC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G										

FIG. 15B-4

Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat están subrayadas

Cadena Ligera

Número de Kabat	CDR H1 de contacto																																									
	CDR L1-Choithia																																									
	CDR L1-Kabat																																									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
4497	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-HC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-LC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-HCLC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
CDR L2 de contacto																																										
CDR L2-Choithia																																										
CDR L2-Kabat																																										
37	38	39	40	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	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	
4497	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-HC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-LC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-HCLC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
CDR L3 de contacto																																										
CDR L3-Choithia																																										
CDR L3-Kabat																																										
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	
4497	Q	A	E	D	V	A	I	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	
4497.v8-HC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	
4497.v8-LC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	
4497.v8-HCLC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	

FIG. 16A-1

Número EU	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
4497	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-LC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HCLC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S

Número EU	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
4497	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-LC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HCLC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P

Número EU	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FIG. 16A-2

Cadena Pesada

		CDR H1 de contacto										CDR H1-Kabat																															
		CDR H1-Choithia																																									
Número de Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
4497	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S F N S F W M H W V R Q V P G																																										
4497.v8-HC-Cys	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S F N S F W M H W V R Q V P G																																										
4497.v8-LC-Cys	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S F N S F W M H W V R Q V P G																																										
4497.v8-HCLC-Cys	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C S A S G F S F N S F W M H W V R Q V P G																																										
		CDR H2 de contacto										CDR H2-Kabat																															
		CDR H2-Choithia																																									
Número de Kabat		43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
4497	K G L V W I S F T N N E G T T A Y A D S V R G R F I I S R D N A K N T L Y L E M N																																										
4497.v8-HC-Cys	K G L V W I S F T N N E G T T A Y A D S V R G R F I I S R D N A K N T L Y L E M N																																										
4497.v8-LC-Cys	K G L V W I S F T N N E G T T A Y A D S V R G R F I I S R D N A K N T L Y L E M N																																										
4497.v8-HCLC-Cys	K G L V W I S F T N N E G T T A Y A D S V R G R F I I S R D N A K N T L Y L E M N																																										
		CDR H3 de contacto										CDR H3-Choithia										CDR H3-Kabat																					
Número de Kabat		82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
4497	N L R G E D T A V Y C A R G D G G L D D W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P																																										
4497.v8-HC-Cys	N L R G E D T A V Y C A R G D G G L D D W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P																																										
4497.v8-LC-Cys	N L R G E D T A V Y C A R G D G G L D D W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P																																										
4497.v8-HCLC-Cys	N L R G E D T A V Y C A R G D G G L D D W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P																																										

FIG. 16B-1

Número EU	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	
4497	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-HC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-LC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-HCLC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
Número EU	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	
4497	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-LC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HCLC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
Número EU	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	
4497	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	F	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-HC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	F	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-LC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	F	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-HCLC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	F	K	P	K	D	T	L	M	I	
Número EU	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	
4497	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	Q		
4497.v8-HC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	Q		
4497.v8-LC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	Q		
4497.v8-HCLC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	Q		
Número EU	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	
4497	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-HC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-LC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-HCLC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
Número EU	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	
4497	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-LC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HCLC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V

FIG. 16B-2

Número EU	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421			
4497	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N			
4497.v8-HC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N			
4497.v8-LC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N			
4497.v8-HCLC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N			
Número EU	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446																				
4497	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																				
4497.v8-HC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																				
4497.v8-LC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																				
4497.v8-HCLC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																				

FIG. 16B-3

Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de Kabat están subrayadas

Cadena Ligera

Número de Kabat	CDR L1 de contacto																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
	CDR L1-Choithia																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
	CDR L1-Kabat																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

CDR L2 de contacto

CDR L2-Choithia	CDR L2-Kabat
-----------------	--------------

Número de Kabat	37	38	39	40	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	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
6078	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6263	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
4450	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6297	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	V	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6239	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6232	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6259	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6292	Q	Q	K	P	A	G	Q	A	P	M	I	L	V	S	G	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L
4462	R	H	K	A	G	Q	A	P	N	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6265	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	V	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
6253	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
4497	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	
4487	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	E	F	T	L	T	I	S	S	L	

FIG. 17A-1

		CDR L3 de contacto			Región constante, numeración EU																																							
		CDR L3-Choithia																																										
		CDR L3-Kabat																																										
Número de Kabat	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119		
6078	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6263	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
4450	E	P	E	D	F	A	M	Y	Y	C	H	K	Y	G	S	G	P	.	R	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6297	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	K	Y	G	S	T	P	.	R	P	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6239	Q	P	E	D	V	A	T	Y	Y	C	E	K	Y	G	S	T	P	.	R	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6232	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	L	I	T	S	S	R	A	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P		
6259	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6292	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	S	F	S	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
4462	Q	S	E	D	F	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	N	T	W	P	.	R	T	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6265	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	N	N	Y	V	.	H	S	F	G	G	P	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6253	Q	P	D	D	L	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Q	.	.	W	S	F	G	Q	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
4497	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	.	Y	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P		
4487	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	R	T	P	.	Y	T	F	G	G	G	Q	S	R	L	L	E	M	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P

Número EU	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	
6078	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6263	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4450	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6297	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6239	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6232	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6259	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6292	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4462	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6265	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6253	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4497	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4487	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E

FIG. 17A-2

Número EU	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	
	6078	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6263	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	4450	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6297	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6239	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6232	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6259	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6292	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	4462	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6265	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	6253	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	4497	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
	4487	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S

Número EU	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	
	6078	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6263	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	4450	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6297	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6239	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6232	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6259	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6292	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	4462	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6265	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	6253	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	4497	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
	4487	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C

* La posición 205 EU de cadena ligera marcada con asterisco se puede cambiar por Cys para la conjugación del

FIG. 17A-3

Cadena Pesada

		CDR H1-Choithia		CDR H1 de contacto		CDR H1-Kabat																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
--	--	-----------------	--	--------------------	--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FIG. 17B-1

Región constante, usado el Sistema de Numeración EU

FIG. 17B-2

Número EU 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200
6078 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6263 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
4450 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6297 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6239 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6232 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6259 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6292 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
4462 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6265 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
6253 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
4497 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C
4487 N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C

Número EU 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242
6078 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6263 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
4450 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6297 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6239 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6232 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6259 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6292 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
4462 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6265 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
6253 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
4497 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L
4487 N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L

FIG. 17B-3

Número EU 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284
6078 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6263 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
4450 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6297 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6239 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6232 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6259 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6292 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
4462 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6265 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
6253 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
4497 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
4487 F P P K P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

Número EU 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326
6078 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6263 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
4450 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6297 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6239 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6232 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6259 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6292 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
4462 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6265 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
6253 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
4497 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K
4487 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V V L H Q D W L L N G K E Y K C K V S N K

FIG. 17B-4

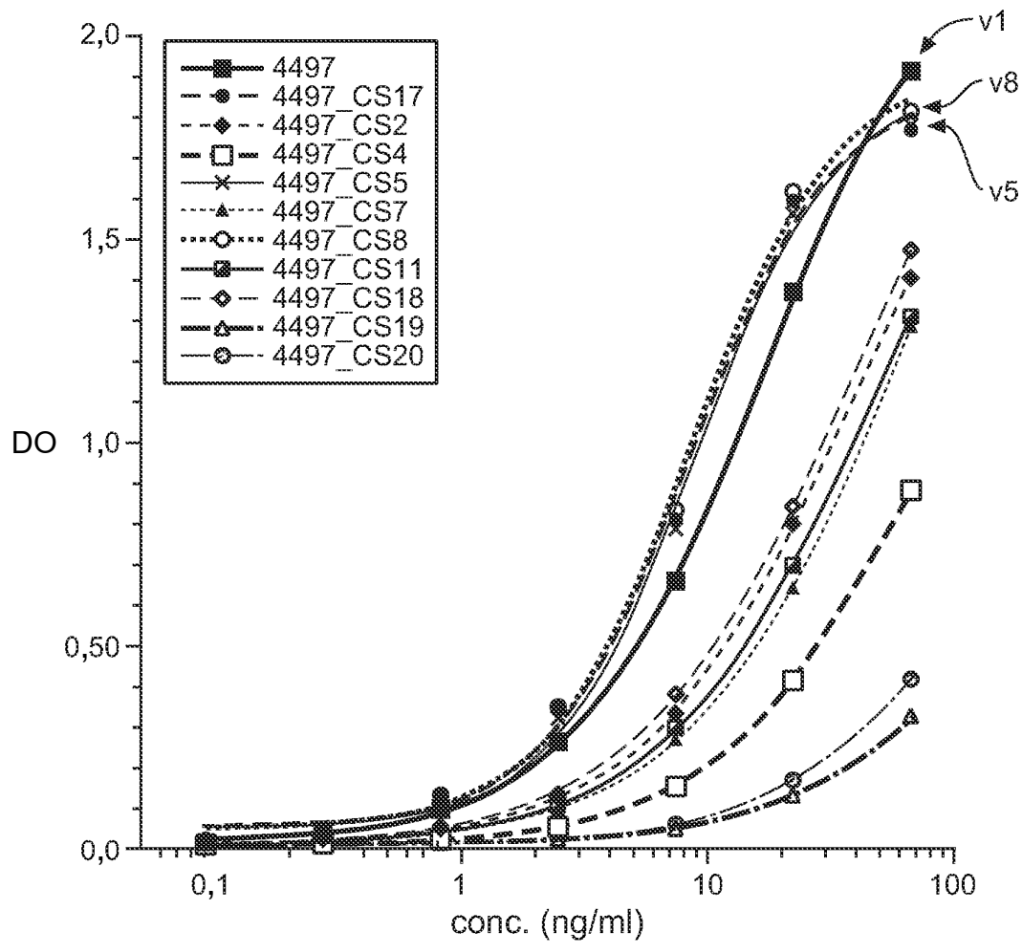
Número EU 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368
6078 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6263 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
4450 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6297 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6239 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6232 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6259 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6292 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
4462 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6265 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
6253 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
4497 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L
4487 A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T T C L

Número EU 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410
6078 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6263 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
4450 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6297 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6239 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6232 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6259 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6292 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
4462 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6265 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
6253 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
4497 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L
4487 V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y Y K K T T P P P V L D S D G S F F L Y S K L

FIG. 17B-5

Número EU	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
6078	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6263	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4450	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6297	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6239	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6232	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6259	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6292	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4462	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6265	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6253	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4487	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	E	E	A	L	H	N	E	V	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

FIG. 17B-6

**FIG. 18A**

	93	94	95	96	97	98	99	101	102	ELISA
TS (v1)	A	R	G	D	G	G	L	D	D	+++
v7				D	G				E	+
v2				D	G				Y	+
v4				D	A				D	+
v19				D	A				E	+/-
v8				E	G				D	+++
v20				E	G				E	+/-
v5				A	G				D	++
v11				A	G				E	+
v18				A	G				Y	+

FIG. 18B

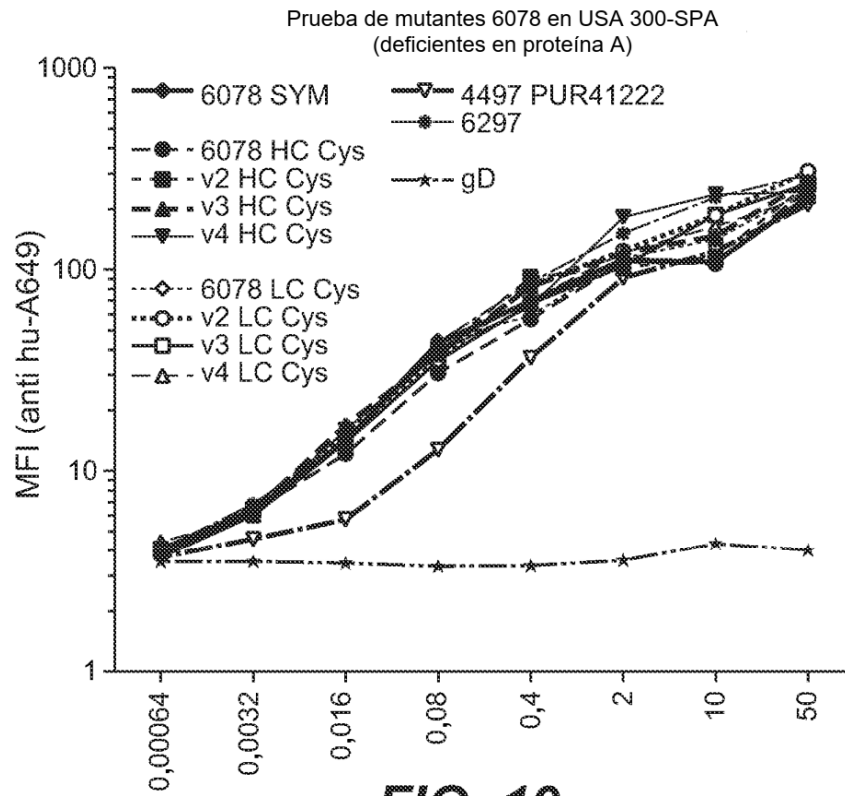


FIG. 19

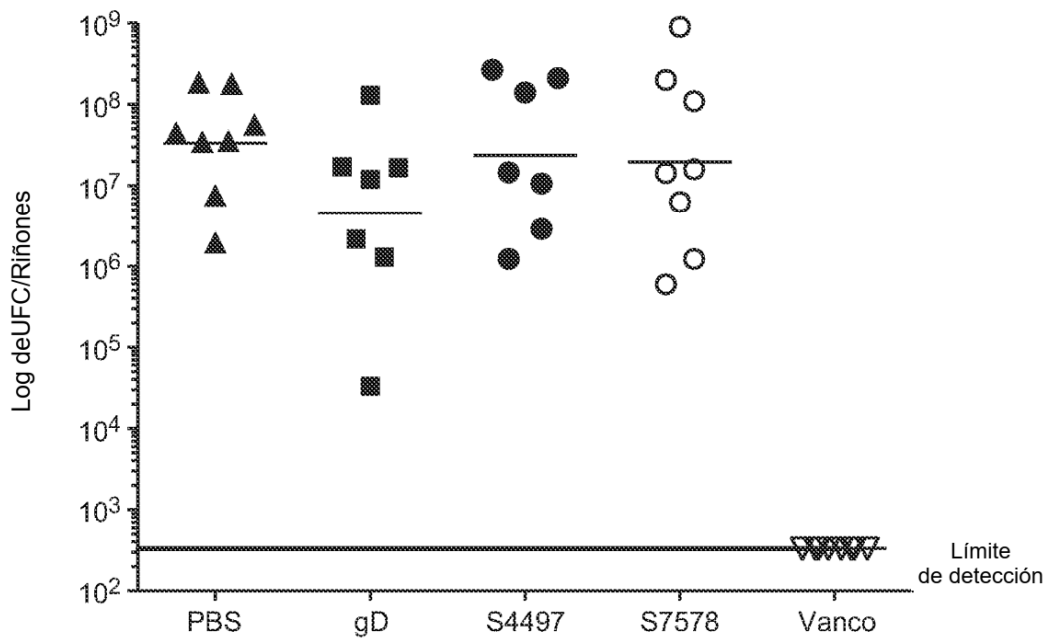
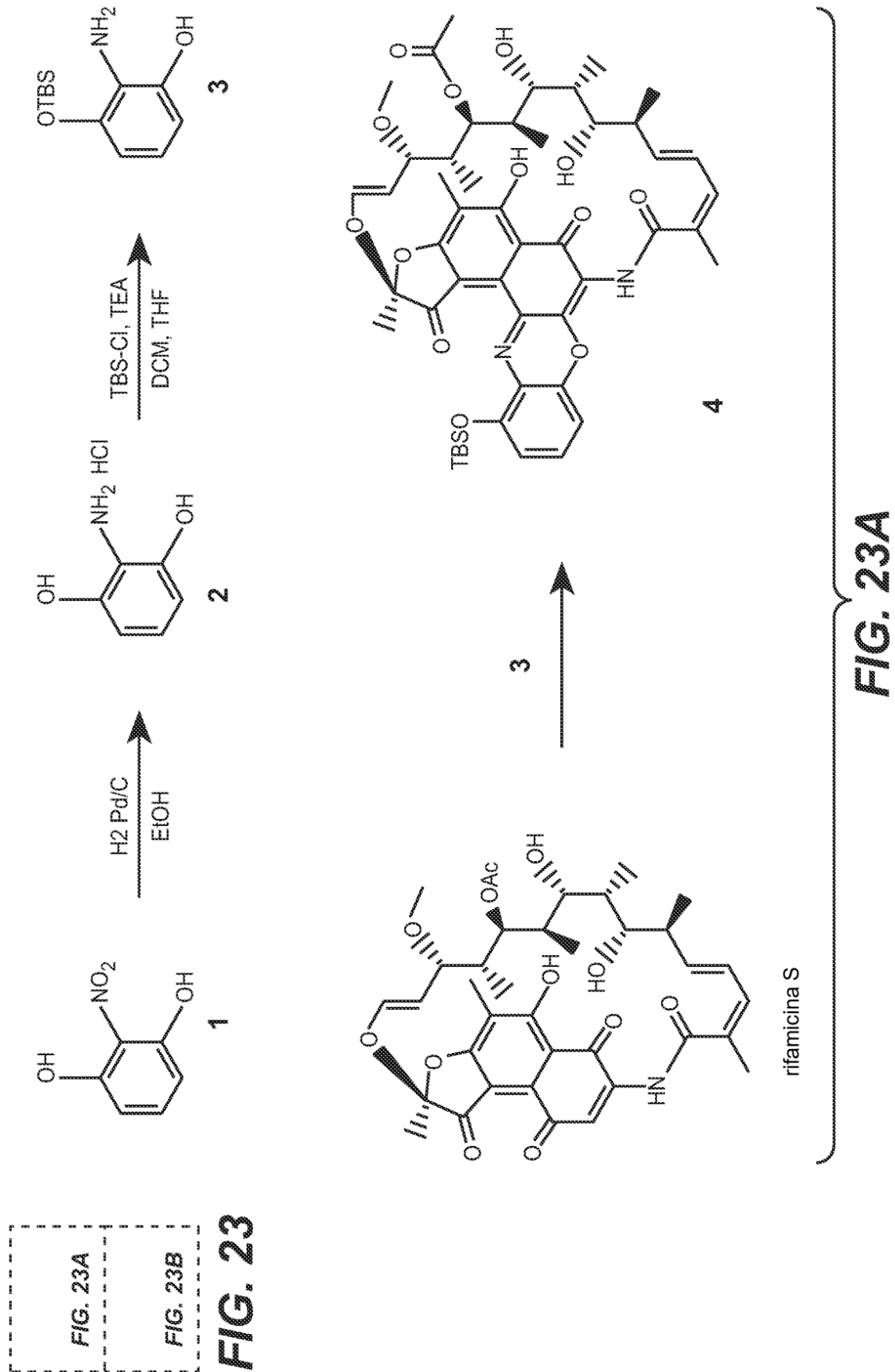


FIG. 20



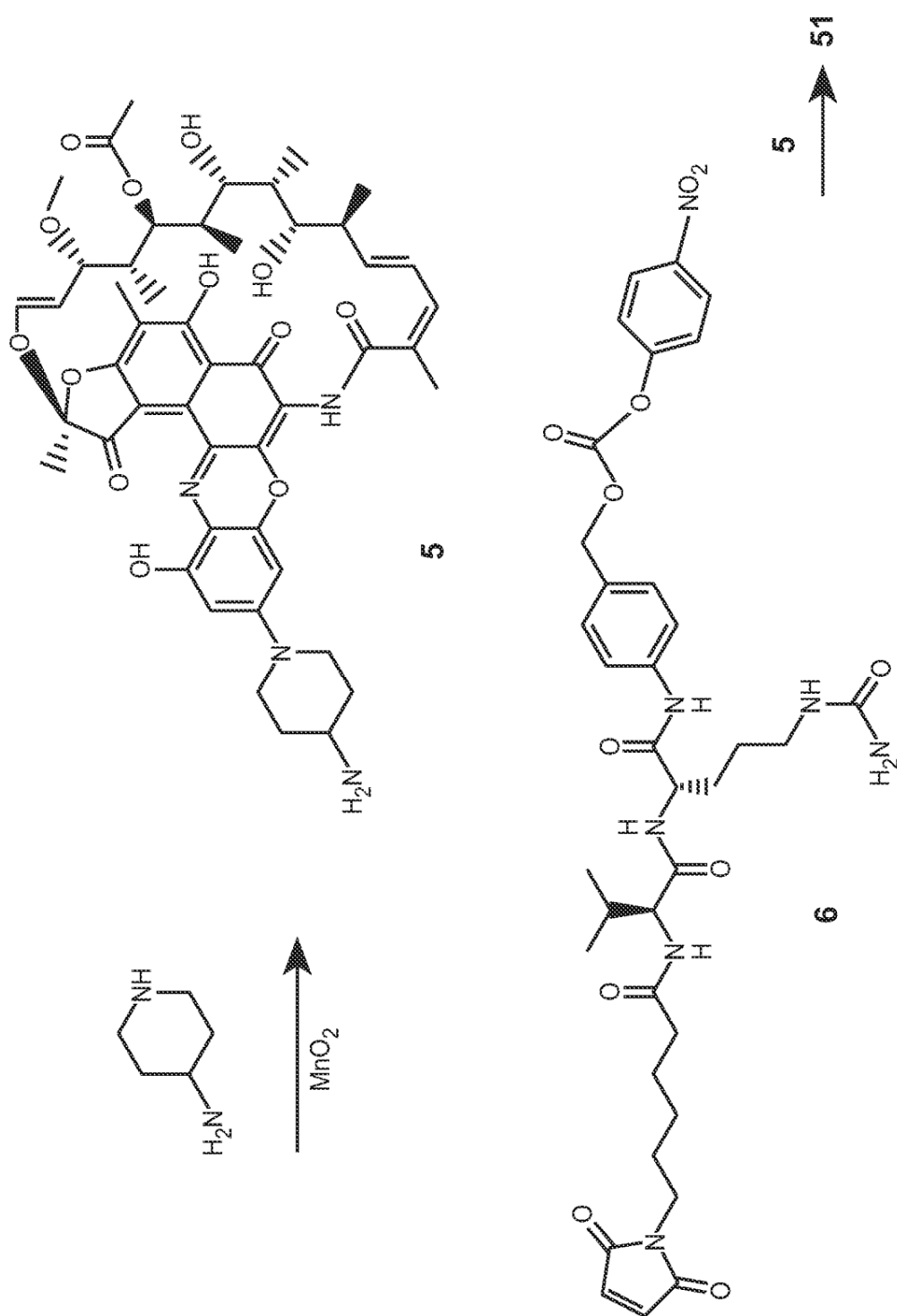


FIG. 23B

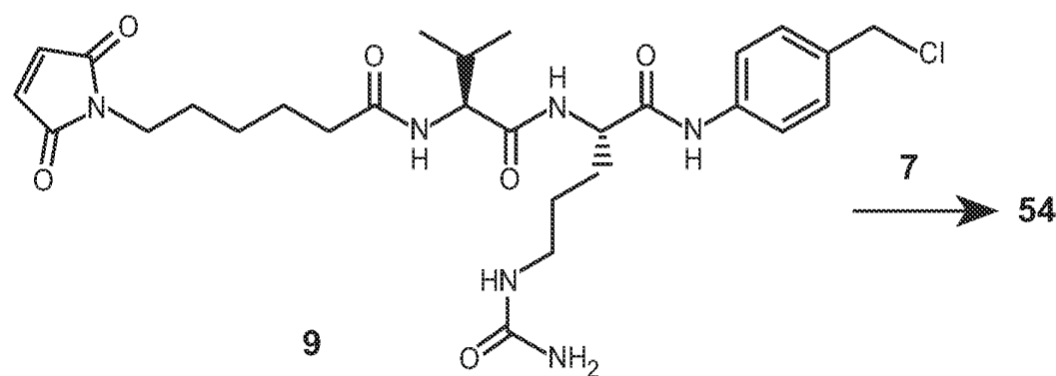
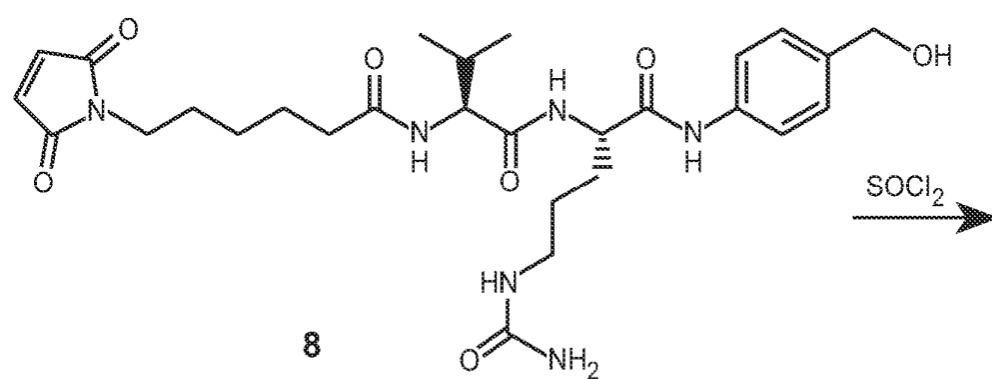
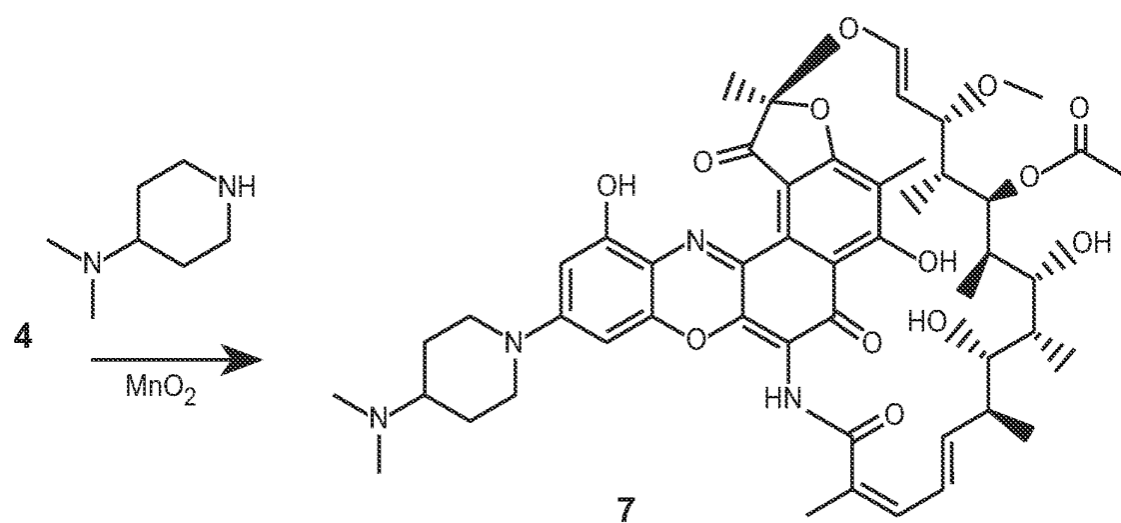
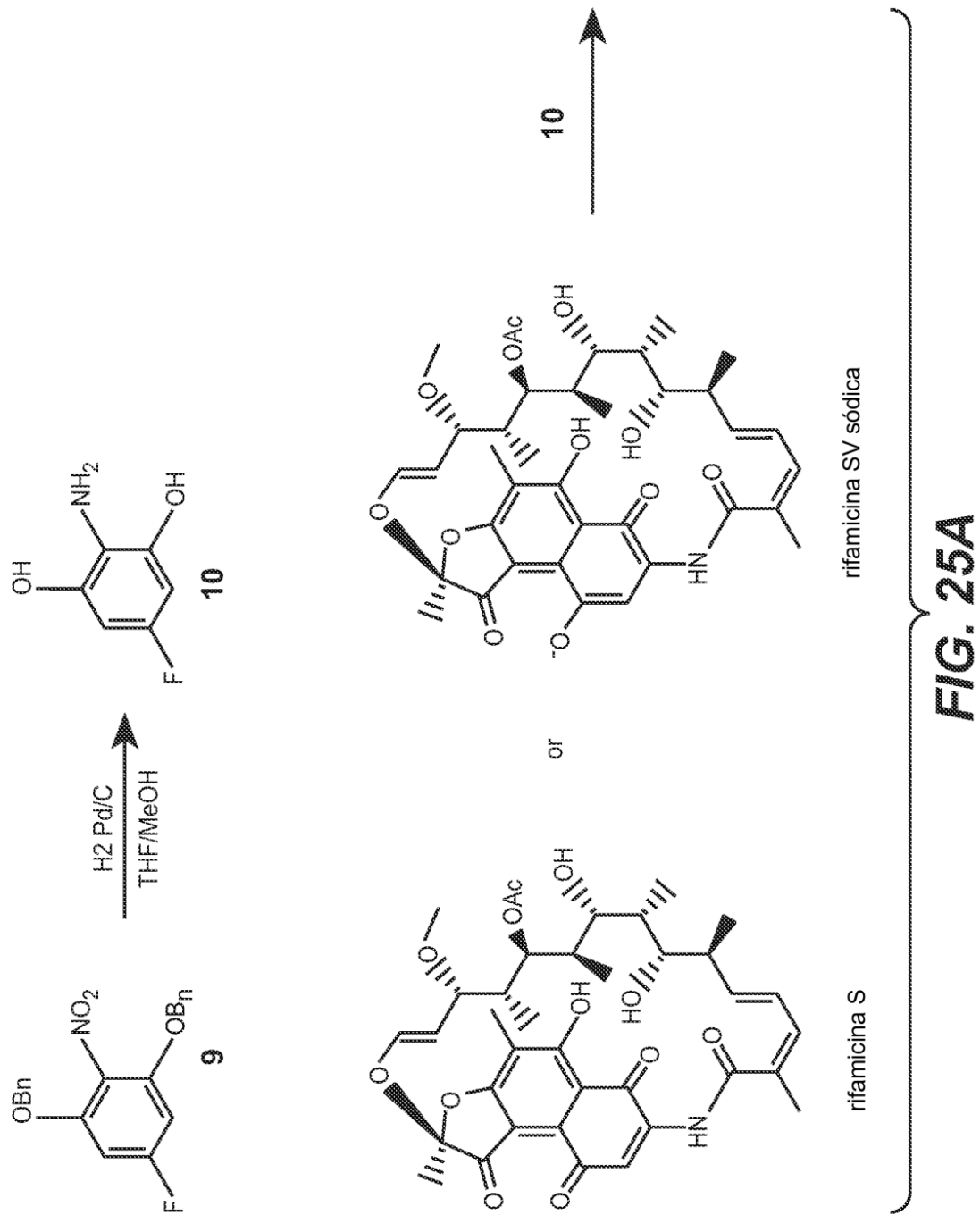
**FIG. 24**

FIG. 25A

FIG. 25B

FIG. 25



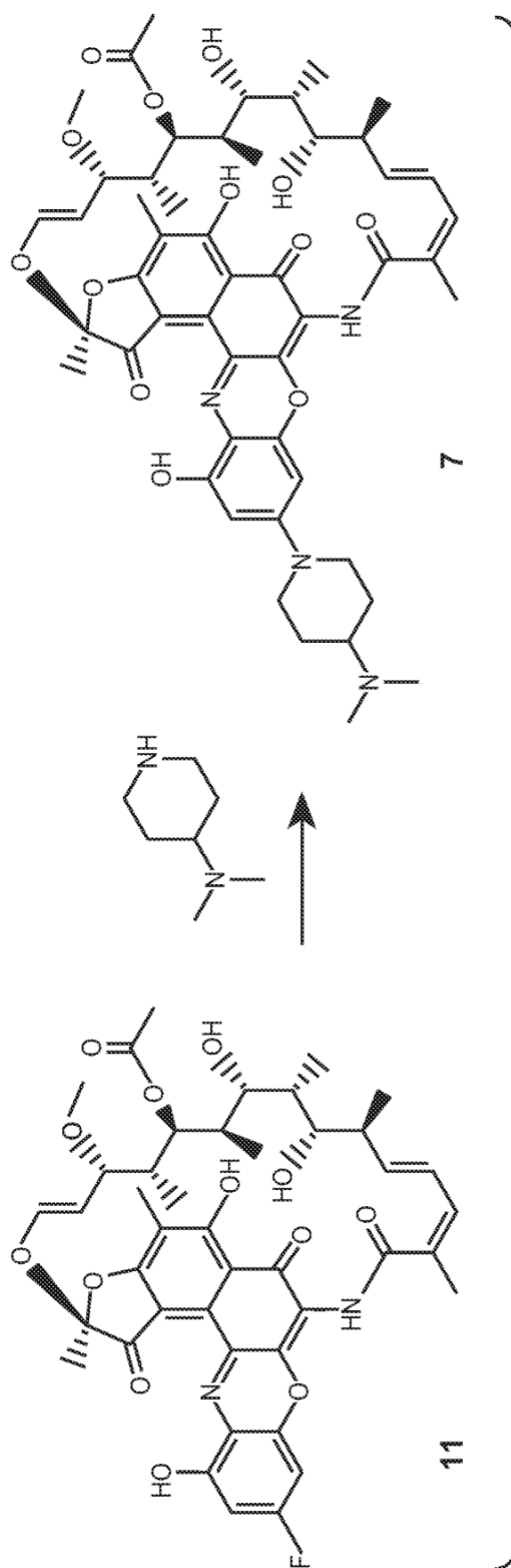


FIG. 25B

Sustrato FRET para validación de la escisión, MP-K
(Tamra)GGAFAGGGK(Fluoresceína)

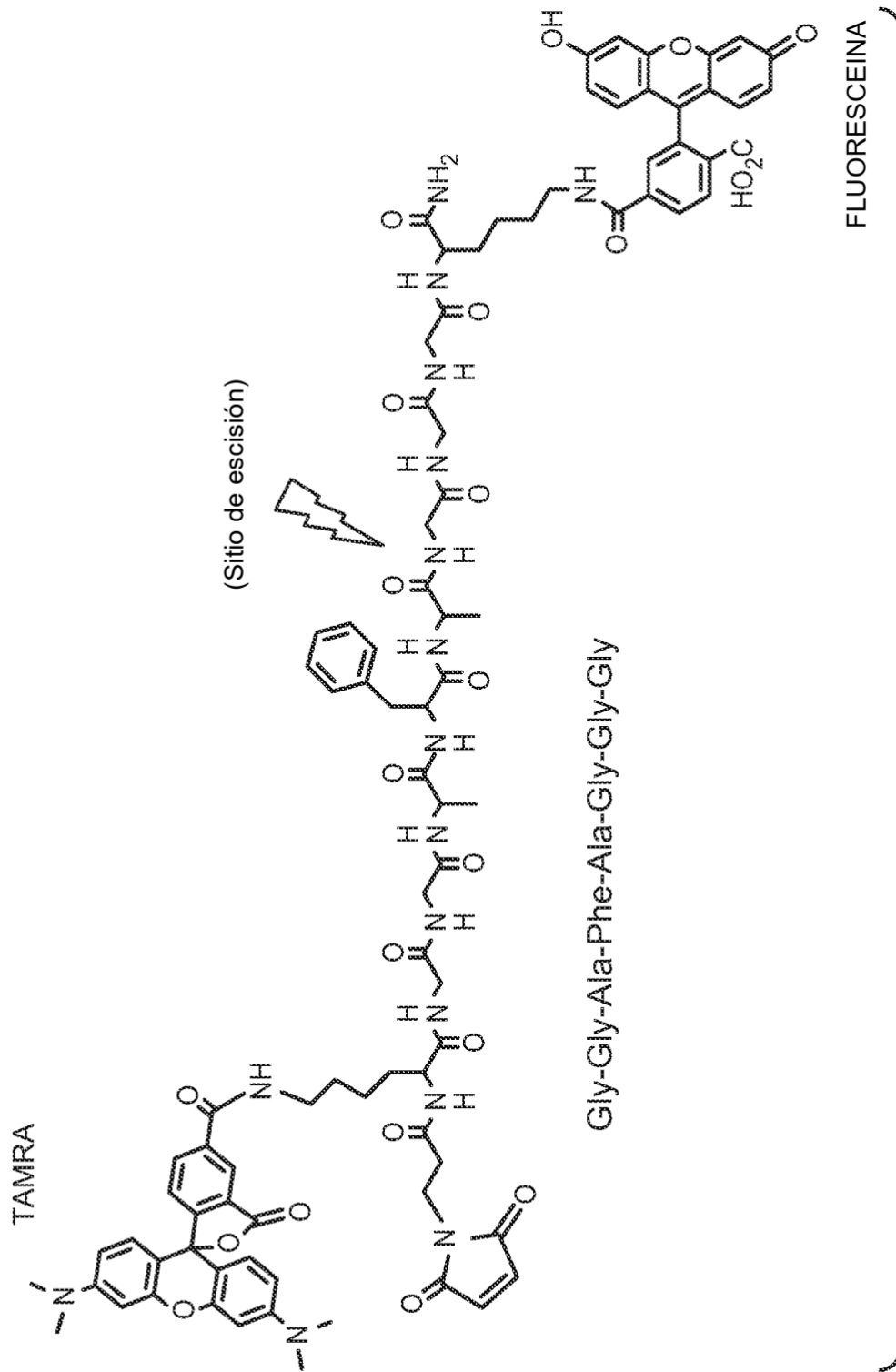
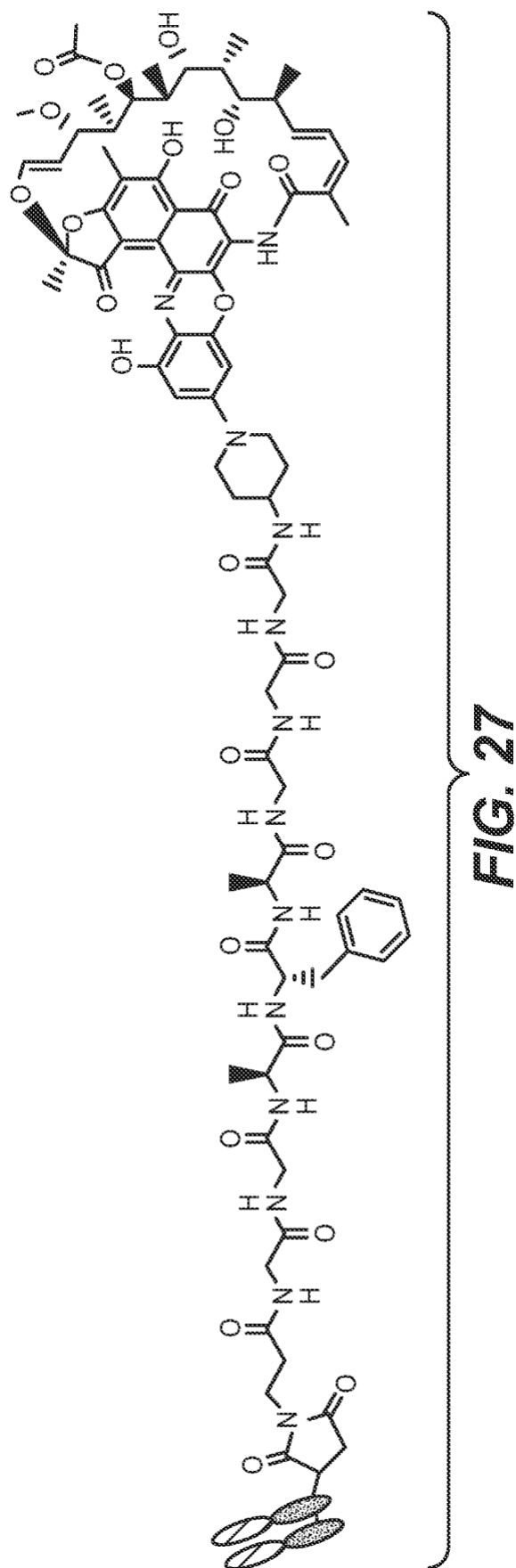


FIG. 26



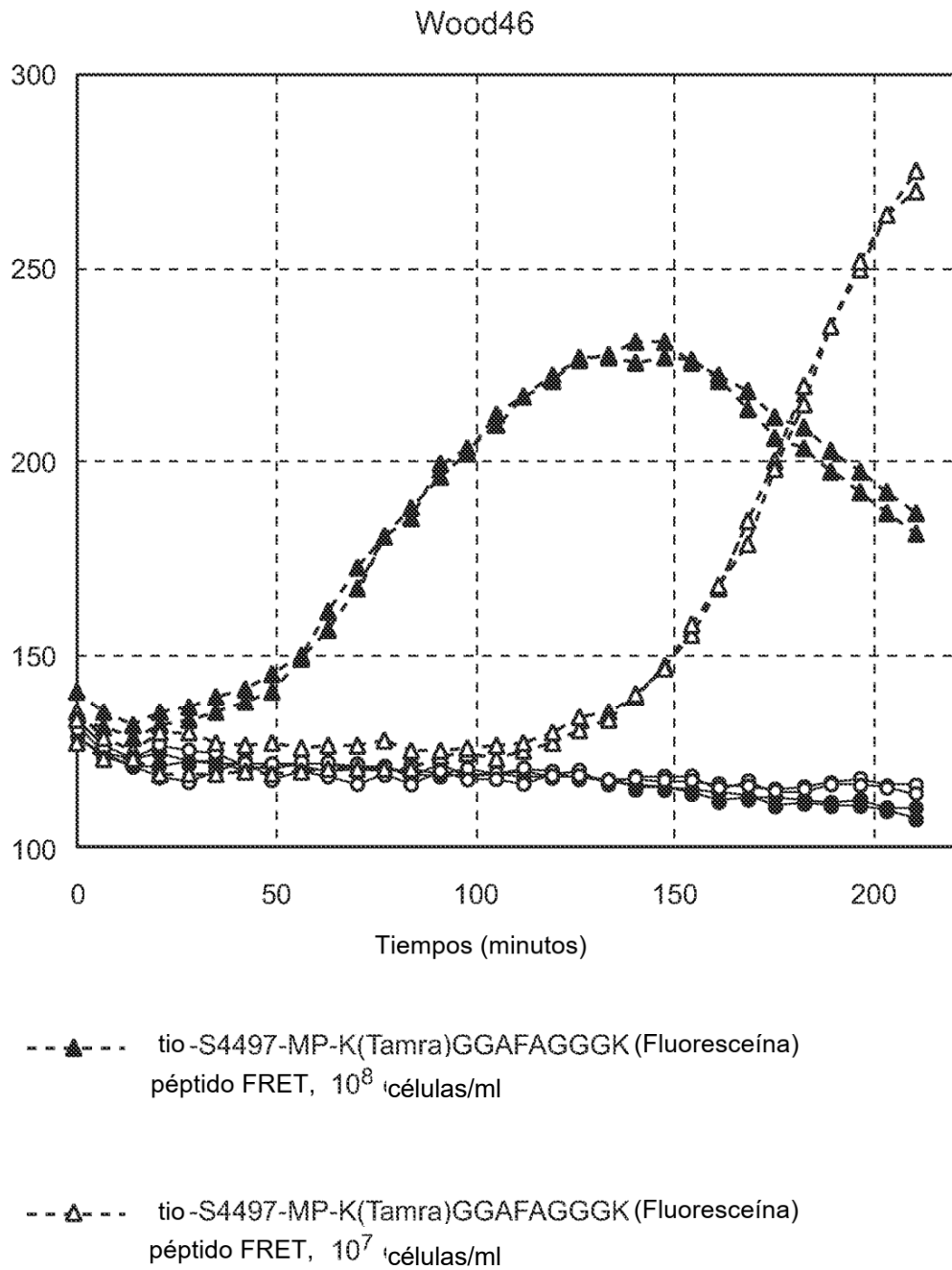
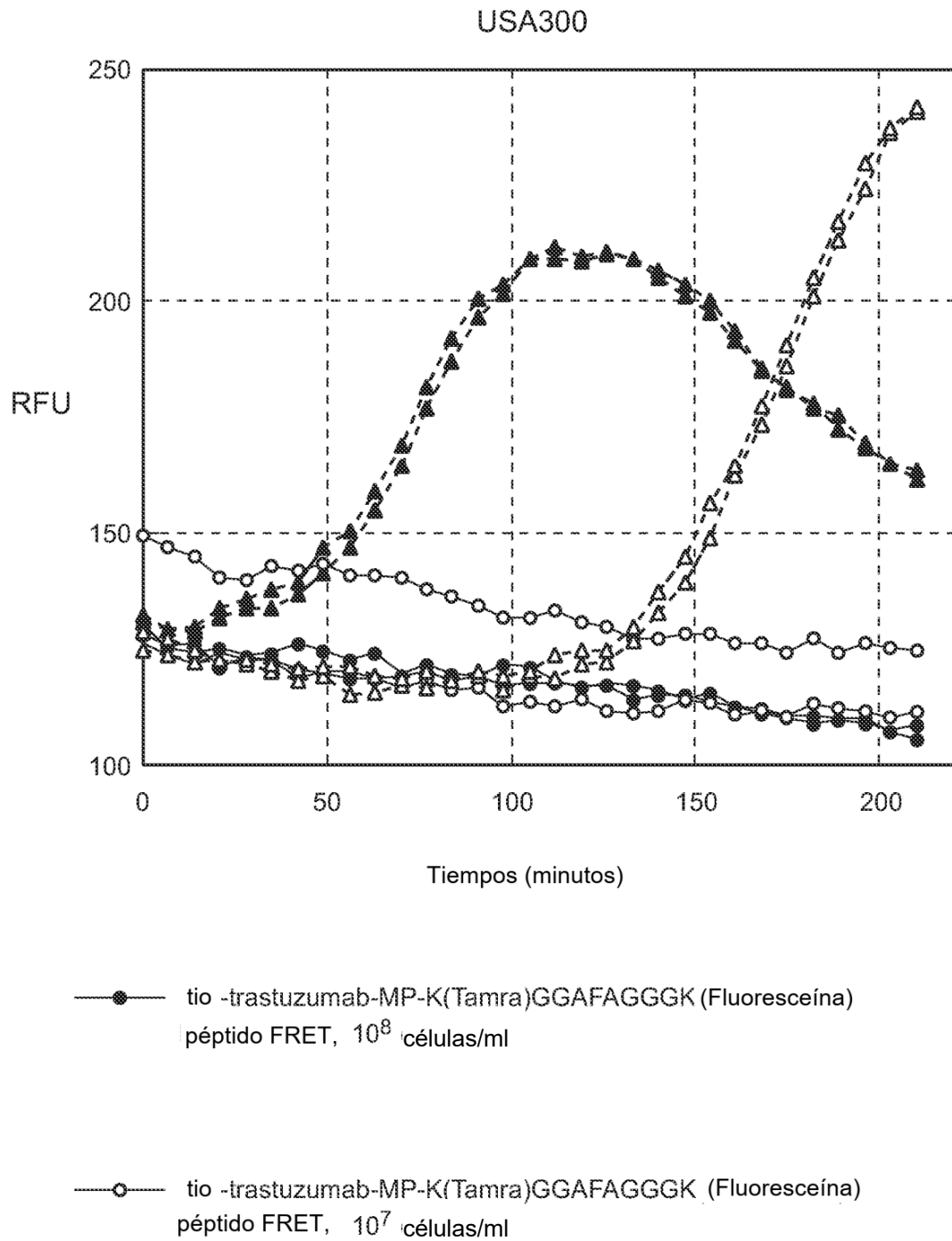
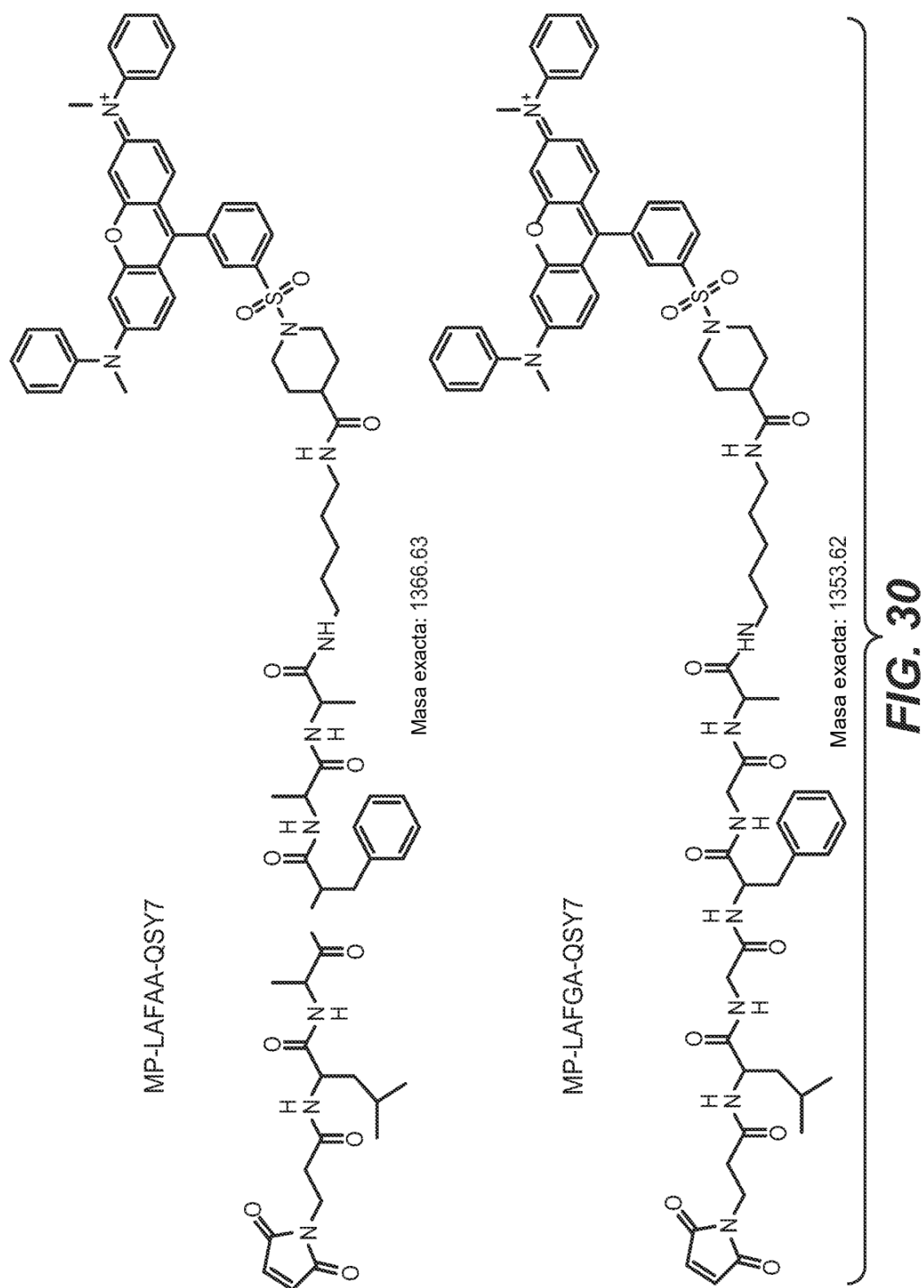


FIG. 28

**FIG. 29**



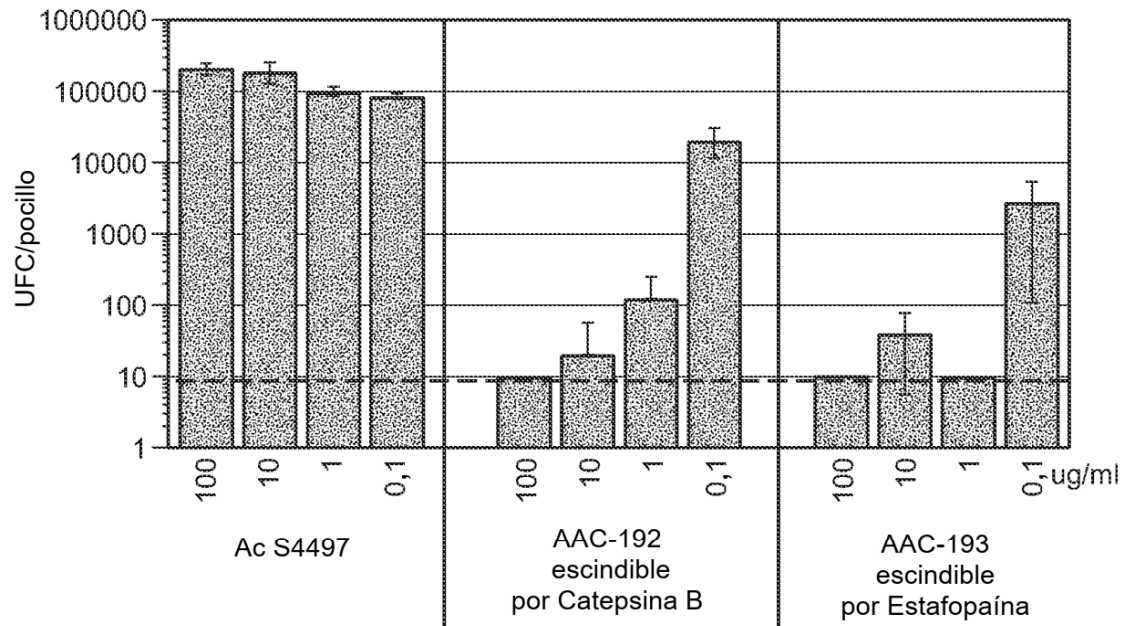


FIG. 31

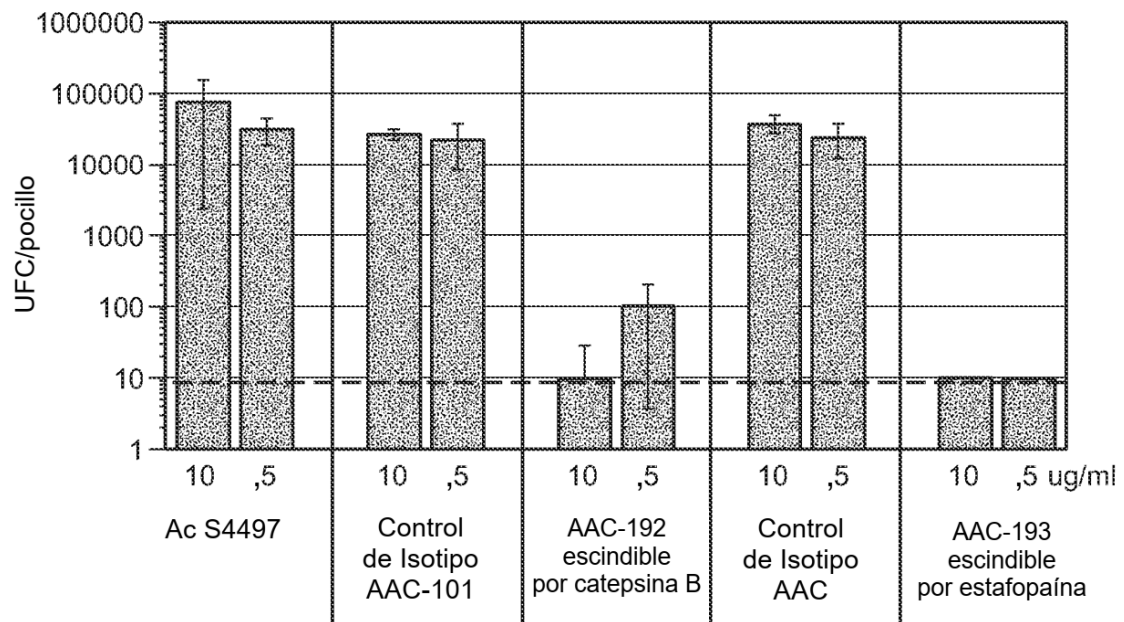


FIG. 32

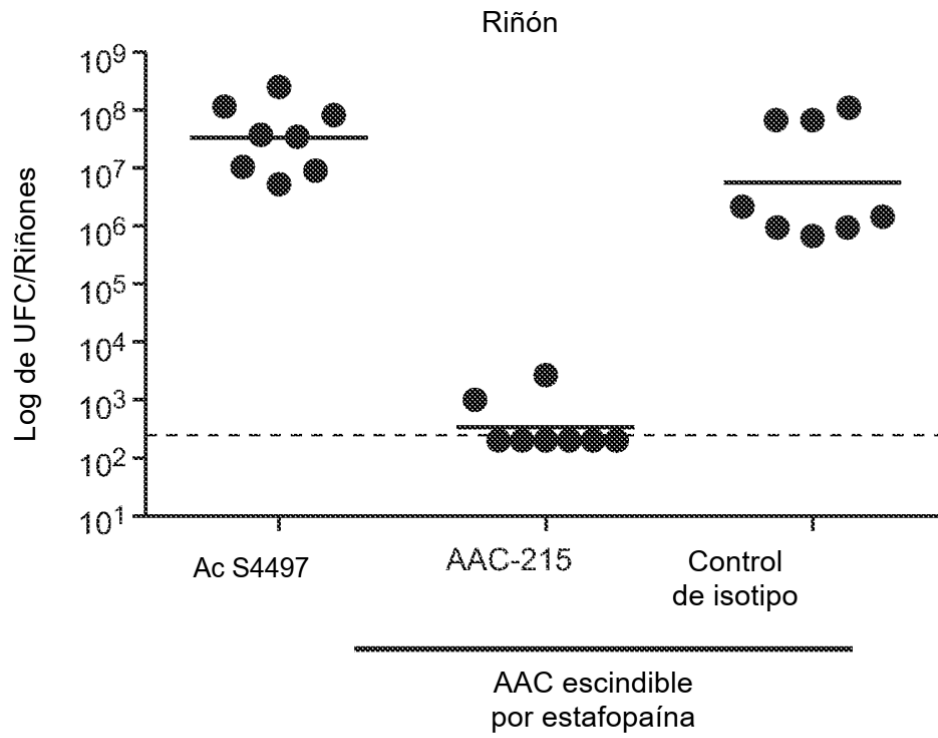


FIG. 33

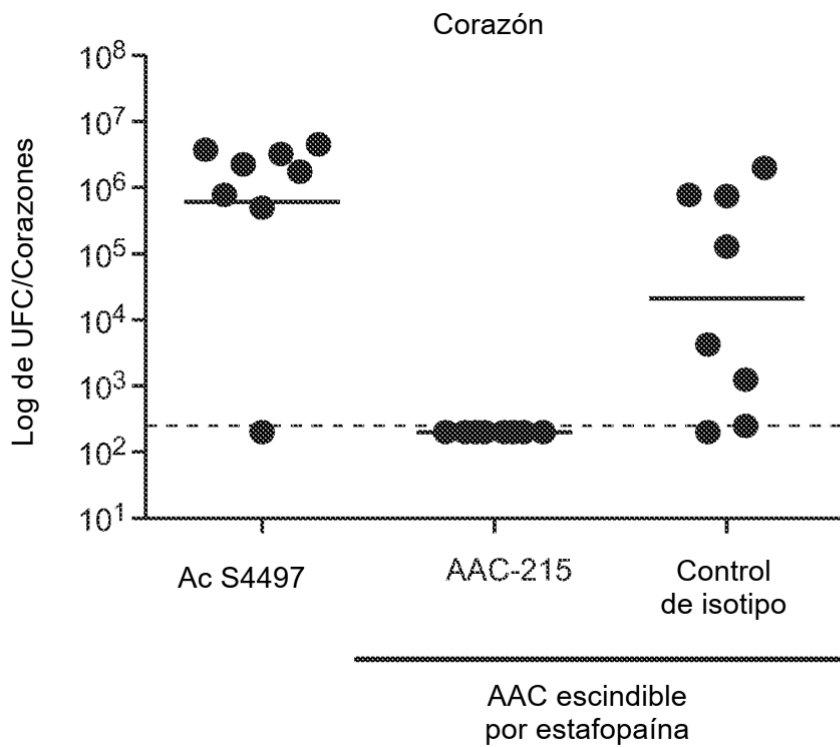


FIG. 34

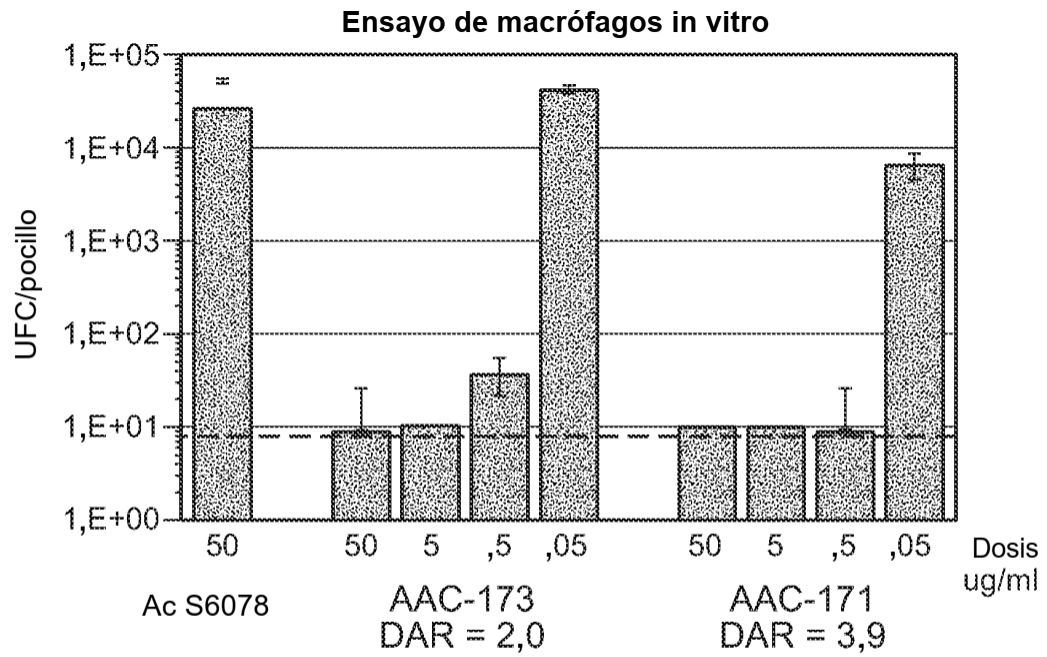


FIG. 35

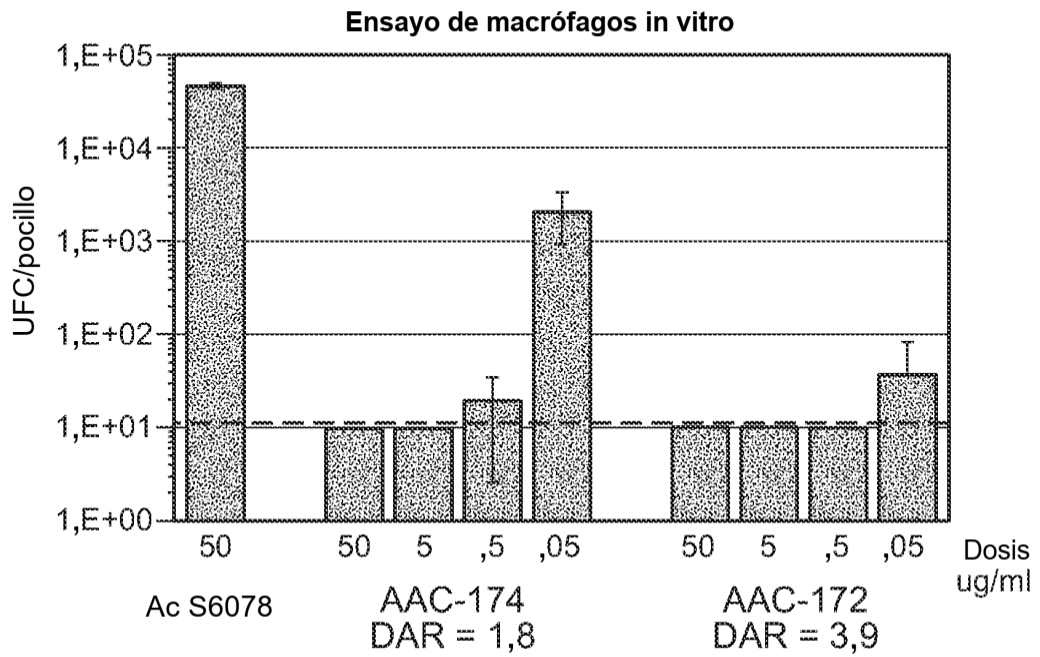


FIG. 36

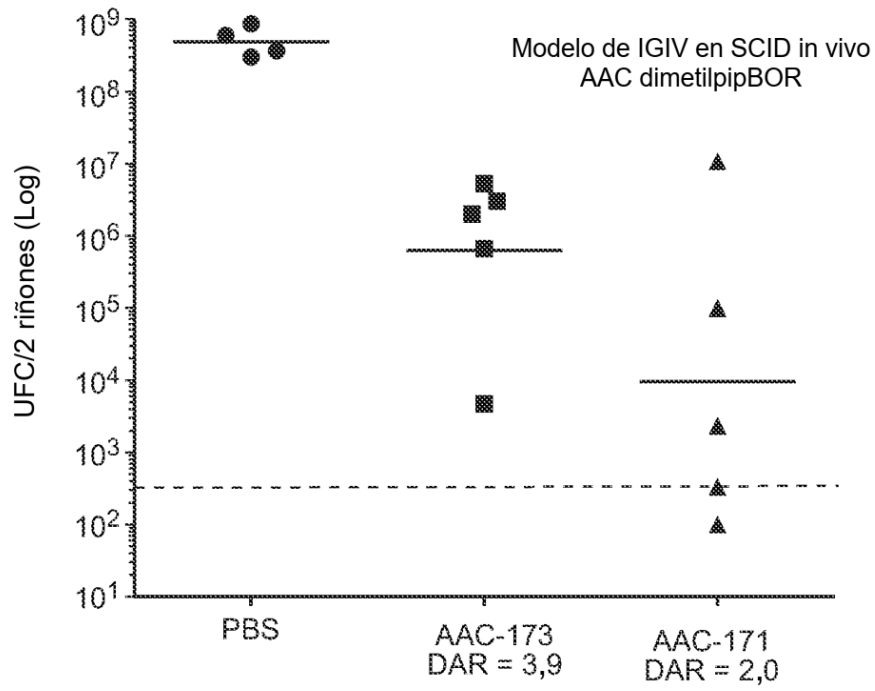


FIG. 37

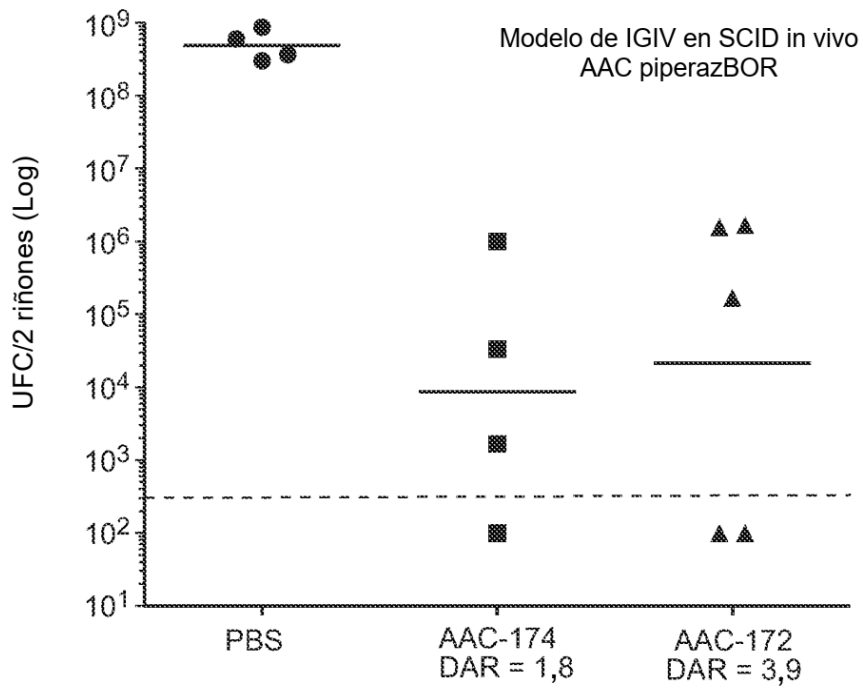


FIG. 38